

Ana Cecília Coelho Rodrigues

# **IDENTIFICAÇÃO DE DERIVADOS XANTÓNICOS COMO POTENCIAIS INDUTORES/ATIVADORES DA GLICOPROTEÍNA-P**

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em  
Toxicologia Analítica, Clínica e Forense**

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos e da  
Doutora Renata Sofia Araújo da Silva



Novembro 2016







**Trabalho realizado sob a orientação de:**

- Prof. Doutora Maria de Lourdes Bastos

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/ UCIBIO-REQUIMTE,  
Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do  
Porto.

- Doutora Renata Sofia Araújo da Silva

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/ UCIBIO-REQUIMTE,  
Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do  
Porto.



**DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A  
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.**





Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

O presente trabalho foi financiado com recurso a fundos nacionais via FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) e Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), no âmbito do Programa PT2020 (projeto 007265 – UID/QUI/50006/2013).



**Os resultados apresentados neste trabalho fazem parte das seguintes comunicações científicas:**

Martins E, **Rodrigues C**, Silva R, Palmeira A, Sousa E, Lemos A, Puthongking P, Carmo H, Pinto M, Bastos ML, Remião F (2016). P-glycoprotein induction/activation by newly synthesized xanthenes with potential therapeutic application. *In* encontro CIÊNCIA '16 (Encontro com a Ciência e Tecnologia em Portugal), 4 - 6<sup>th</sup> July, Lisboa, Portugal.

Martins E, **Rodrigues C**, Palmeira A, Sousa E, Lemos A, Puthongking P, Carmo H, Pinto M, Bastos ML, Remião F and Silva R (2016). P-glycoprotein induction/activation by newly synthesized xanthenes with potential therapeutic application. *In I Annual Meeting of the Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmacy University of Porto, 19<sup>th</sup> July, Porto, Portugal.*

Rito T, Martins E, **Rodrigues C**, Palmeira A, Sousa E, Lemos A, Puthongking P, Carmo H, Pinto M, Bastos ML, Remião F and Silva R (2016). Study of the cytotoxicity and potential p-gp modulation of newly synthesized xanthenes with therapeutic potential *In I Annual Meeting of the Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmacy University of Porto, 19<sup>th</sup> July, Porto, Portugal.*



*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
Mas não esqueço de que a minha vida  
É a maior empresa do mundo...  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história...  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
Um oásis no recôndito da sua alma...  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta...”*

*Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

Fernando Pessoa



## AGRADECIMENTOS

Sendo o culminar de uma etapa de extrema importância para mim, jamais pode ser finalizada sem agradecer a todos os que me acompanharam ao longo deste tempo. Não foi, de todo, um trabalho individual. Foi um trabalho de equipa, quer no “terreno”, quer com um simples sorriso ou palavra de ânimo.

À Prof. Doutora Maria de Lourdes, pela forma entusiasta como orienta o Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense. Como orientadora desta tese, agradeço a disponibilidade e prontidão para dar resposta às mais variadas situações inerentes à realização deste trabalho. Agradeço também o estímulo e o espírito científico inculcado durante esta etapa.

À Doutora Renata Silva, coorientadora desta tese, agradeço a enorme disponibilidade e apoio durante a realização dos trabalhos práticos. Obrigada por todos os “salvamentos” que fez independentemente da hora, dia da semana, localização geográfica ou gravidade da situação. Fê-lo sempre com um sorriso ou gargalhada mesmo quando eu pensava que o mundo ia acabar. Não acabou.

À Eva Martins, agradeço toda a ajuda, disponibilidade e simpatia desde o início. Obrigada pelas horas infinitas que passamos entre o piso 4 e o 5, obrigada por nunca me desamparares, obrigada pelos almoços às 16h e jantares às 00h, obrigada pelas palhaçadas, pelas *selfies*, pelos desabafos. És brilhante!

Ao Rui e à Ana agradeço as horas de trabalho partilhadas sempre com boa disposição mesmo quando já imperava a fome e o desânimo. Obrigada pela amizade.

A todos os colegas com quem me fui cruzando no Laboratório de Toxicologia, o meu agradecimento pelo apoio, pelas brincadeiras, pelos desesperos partilhados, pelo bom ambiente. É bom saber que não estamos sozinhos na luta.

Às minhas colegas de trabalho da Escola Superior de Saúde Stéphanie, Teresa, Anabela, Marlene e Dr<sup>a</sup> Manuela agradeço o apoio, o incentivo e compreensão durante esta etapa.

Aos meus amigos Gui, Michelle, Catarina e João Pedro, agradeço a amizade incondicional, o incentivo e o enorme carinho.

Às minhas tias Adelina e Olinda, agradeço a constante preocupação e por me tratarem como uma filha. Aos meus tios José e Joaquim, agradeço a boa disposição. Cada um à sua maneira, são os cromos 101 e 102 numa caderneta de 100.

À minha madrinha, Teresa, sempre disposta a travar qualquer batalha por mim. “É p’ra guerra!”.

Aos meus primos Ricardo, Luís e Afonso pelas palermices e gargalhadas; pelo constante apoio mútuo; pelos cuidados; pela presença; por serem irmãos de pais diferentes; pelo carinho desde sempre e para sempre. Ricardo, só queremos “livrar”. E “livramos”!

Às minhas Avós, Ana e Cecília, presenças fundamentais. A ambas agradeço o orgulho e amor eterno que nutrem por mim. A ambas o reconhecimento que lhes é devido.

Aos meus Pais, Rosalina e César, por Tudo. Pela confiança que sempre me depositaram; pelos valores desde sempre inculcados; pelo imenso orgulho que sentem; pela enorme paciência (sim, é mesmo muito grande); pela presença; pelo Amor. À minha Mãe, por nunca me deixar em alto mar quando já não tenho mais força nem vontade de remar; agradeço por todas as vezes que me arrastou para terra firme para que continuasse nas batalhas a que me propunha. Ao meu Pai, pela bravura; por me fazer sempre sentir a melhor do Mundo mesmo quando tudo indica o contrário. Tudo isto é pouco, muito pouco. Merecem o melhor.

Ao Sr. Paulo, por me inculcar desde o primeiro dia os valores de esperança e crença porque, afinal, “está tudo bem” e “vai correr tudo bem”. Esta vida não chega para lhe agradecer.

É possível que me possa ter esquecido de mencionar alguém assim como qualquer palavra aqui escrita é muito pouco comparada à gratidão que sinto por todo o apoio recebido ao longo desta etapa.







## RESUMO

A Glicoproteína-P (P-gp/MDR1) é, à data, uma das mais estudadas entre as proteínas transmembranares envolvidas no transporte de compostos, dada a sua importante função como bomba de efluxo, impedindo a acumulação intracelular de compostos potencialmente tóxicos, a sua ampla distribuição em diversos órgãos e tecidos, e a sua capacidade de transportar uma vasta diversidade de substratos. Desta forma confere uma importante proteção celular, sendo o mecanismo de indução/ativação desta bomba de efluxo um processo vastamente estudado. Diversos estudos têm sido realizados de modo a testar novos compostos que possam atuar na modulação desta proteína e, desta forma, promover a proteção celular em caso de toxicidade.

Dado o papel fisiológico da P-gp, o presente trabalho teve como principais objetivos avaliar o efeito de dezoito novos derivados xantônicos (**AX1-AX18**) na expressão e atividade da P-gp, e o seu potencial de proteção de células Caco-2 contra a toxicidade mediada pelos seus substratos tóxicos, tal como o Paraquato (PQ), um herbicida extremamente tóxico e associado a inúmeras intoxicações intencionais e acidentais. Neste estudo, as células Caco-2 foram utilizadas como modelo *in vitro* do epitélio intestinal humano uma vez que este modelo celular foi já previamente validado para a pesquisa e identificação de compostos com capacidade de modular a P-gp, influenciando a sua expressão e/ou atividade. Desta forma, procedeu-se inicialmente à avaliação da citotoxicidade das xantonas testadas, pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, de modo a selecionar uma concentração não citotóxica de trabalho. Posteriormente, selecionou-se a concentração de 20 µM e procedeu-se à avaliação dos efeitos dos novos derivados xantônicos na expressão e atividade da P-gp, à avaliação dos seus efeitos na atividade ATPásica desta bomba de efluxo e, por último, à avaliação dos efeitos protetores destes compostos contra a citotoxicidade induzida pelo PQ. De toda a investigação realizada, importa realçar que os derivados xantônicos testados não provocaram citotoxicidade em concentrações iguais ou inferiores a 20 µM; após 24 h de exposição. As xantonas **AX1**, **AX2**, **AX5**, **AX6**, **AX7**, **AX12**, **AX13** e **AX17** mostraram aumentar significativamente, e de forma imediata, a atividade da P-gp, demonstrando, assim, a capacidade de funcionarem como ativadores desta bomba

de efluxo. Dos compostos que funcionaram como ativadores da P-gp, apenas a **AX1**, **AX2**, **AX7**, **AX12** e **AX13** conferiram uma redução na citotoxicidade do PQ. De facto, a **AX5**, **AX6** e **AX17**, apesar de ativarem esta bomba de efluxo, falharam em conferir proteção contra a citotoxicidade induzida pelo PQ.

Dos compostos testados, apenas a **AX3**, **AX8** e **AX9** aumentaram significativamente a síntese *de novo* da P-gp, 24 h após exposição. Contudo, foi possível verificar a ausência de proporcionalidade entre o aumento observado na expressão da P-gp e o correspondente aumento na sua atividade. Por outro lado, dos compostos que demonstraram a capacidade de funcionarem como indutores da P-gp, apenas a exposição simultânea a PQ e à **AX9** resultou numa proteção eficaz contra a citotoxicidade induzida pelo herbicida. Por outro lado, alguns dos derivados xantónicos testados, nomeadamente a **AX4**, **AX10**, **AX11** e **AX14**, conferiram proteção contra a citotoxicidade do PQ, apesar de não se verificar qualquer efeito significativo na expressão e atividade da P-gp. Deste modo, importa continuar a investigação de modo a perceber se os efeitos protetores mediados por algumas das xantonas testadas se deve a um fenómeno de indução/ativação da P-gp, avaliando os seus potenciais efeitos protetores na presença de um inibidor da P-gp. À semelhança, novos estudos deverão ser efetuados para esclarecer quais os mecanismos envolvidos na proteção observada para os derivados xantónicos que não provocaram qualquer efeito significativo na expressão e/ou atividade da P-gp.

Em conclusão, o presente estudo realça-se a importância da indução/ativação da P-gp como uma potencial via antidotal em situações de intoxicações por substratos tóxicos da P-gp, tal como o PQ, e salienta que os derivados xantónicos representam uma fonte promissora de novos compostos com capacidade moduladora da expressão e/ou atividade desta importante bomba de efluxo.

**Palavras-chave:** Glicoproteína-P, Indução/ativação, Xantonas, células Caco-2, Paraquato, Citotoxicidade

## ABSTRACT

P-glycoprotein (P-gp / MDR1) is, up to date, one of the most studied among transmembrane proteins involved in the transport of compounds, given its importance as an efflux pump, preventing the intracellular accumulation of potentially toxic compounds, its widely distribution in several organs and tissues, and its ability to transport a wide variety of substrates. Consequently, it confers an important cellular protection, being the mechanism of induction/activation of this efflux pump widely studied. Several studies have been performed to test new compounds that may act in the modulation of this protein and, consequently, in the promotion of a cellular protection in case of toxicity.

Given the P-gp physiological role, this work had as main objectives the evaluation of the effect of eighteen newly synthesized xanthonic derivatives (**AX1-AX18**) in P-gp expression and activity, and their potential to protect Caco-2 cell against the toxicity mediated by its toxic substrates, like PQ, a highly toxic herbicide and associated with numerous intentional and accidental intoxications. In this study, Caco-2 cells were used as an *in vitro* model of the human intestinal epithelium, since this cellular model has been previously validated for the screening and identification of compounds able to modulate P-gp, influencing its expression and/or activity.

The cytotoxicity of the tested xanthones was initially evaluated, by the neutral red uptake assay, in order to select a non-cytotoxic working concentration. Subsequently, the 20  $\mu$ M concentration was selected, followed by the evaluation of the effects of the newly xanthonic derivatives on P-gp expression and activity, by the evaluation of their effects on P-gp ATPase activity and, finally, by the evaluation of the potential protective effects of these xanthonic derivatives against the cytotoxicity induced by PQ. Of all the research carried out, it is noted that the tested xanthonic derivatives did not cause significant cytotoxicity in concentrations equal to or less than 20  $\mu$ M; after 24 h of incubation. Xanthones **AX1**, **AX2**, **AX5**, **AX6**, **AX7**, **AX12**, **AX13** and **AX17** significantly, and immediately, increased P-gp activity, thus demonstrating the ability to act as activators of this efflux pump. Within the compounds that functioned as P-gp activators, only **AX1**, **AX2**, **AX7**, **AX12** and **AX13** were able to significantly reduce PQ toxicity. In fact, **AX5**, **AX6**, and **AX17**,

although significantly activated this efflux pump, failed to confer protection against the cytotoxicity induced by PQ.

From the tested compounds, only **AX3**, **AX8** and **AX9** significantly increased *de novo* synthesis of P-gp, 24 h after exposure. However, it was noted a lack of proportionality between the observed increase in P-gp expression and the corresponding increase in its activity. Moreover, within the compounds that have demonstrated the ability to act as P-gp inducers, only the simultaneous exposure to PQ and **AX9** resulted in an effective protection against the cytotoxicity induced by the herbicide. On the other hand, some of the tested xanthonic derivatives, namely **AX4**, **AX10**, **AX11** and **AX14**, conferred a significant protection against PQ cytotoxicity, although the absence of significant effects on P-gp expression and activity. Thus, it is important to continue the research to demonstrate if the protective effects mediated by some of the tested xanthonones are associated with a phenomenon of P-gp induction/activation, assessing their potential protective effects in the presence of a P-gp inhibitor. Similarly, new studies should be conducted to clarify the mechanisms involved in the significant protection observed for some of the xanthonic derivatives, which did not cause any significant effect on the P-gp expression and/or activity.

In conclusion, this study highlights the importance of P-gp induction/activation as a potential antidotal pathway in cases of intoxications by toxic P-gp substrates, such as PQ, and demonstrates that xanthonic derivatives are a promising source of new compounds able to modulate the expression and/or activity of this important efflux pump.

**Keywords:** P-Glycoprotein, induction/activation, xanthonones, Caco-2 cells, Paraquat, Cytotoxicity

**ÍNDICE**

AGRADECIMENTOS .....	xv
RESUMO .....	xix
ABSTRACT .....	xxi
ÍNDICE .....	xxiii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xxvii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xxix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxxi
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	xxxiii
PARTE I .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. A Glicoproteína-P.....	4
1.1.1. Estrutura .....	4
1.1.2. Distribuição tecidual e papel fisiológico .....	5
1.1.3. Substratos e mecanismos de efluxo .....	7
1.1.3.1. Substratos da P-gp.....	7
1.1.3.2. Mecanismo de Efluxo .....	8
1.1.3.3. Ciclo catalítico e de transporte .....	10
1.1.4. Modulação da P-gp.....	12
1.1.4.1. Mecanismos de Inibição e Inibidores.....	12
1.1.4.2. Mecanismos de Indução e Indutores.....	15
1.1.4.3. Mecanismo de Ativação e Ativadores.....	18
1.1.5. Mecanismos de indução/ativação como possível estratégia em intoxicações por substratos tóxicos da P-gp.....	19
1.1.5.1. Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	19
1.2. Xantonas como potenciais moduladores da P-gp.....	20
PARTE II .....	23

2. Objetivos.....	25
PARTE III .....	27
3. Materiais e Métodos .....	29
3.1. Materiais .....	29
3.2. Síntese de Xantonas.....	29
3.3. Modelo celular Caco-2 .....	30
3.3.1. Cultura celular – células Caco-2.....	31
3.3.1.1. Protocolo experimental para a tripsinização das células .....	31
3.3.1.2. Protocolo experimental para a sementeira das células .....	32
3.3.2. Avaliação da citotoxicidade das xantonas .....	33
3.3.2.1. Ensaio de incorporação do NR .....	33
3.3.3. Avaliação do efeito das xantonas na expressão da P-gp .....	34
3.3.4. Avaliação do efeito das xantonas na atividade da P-gp .....	35
3.3.4.1. Ensaio de acumulação da RHO 123 na presença das xantonas testadas .....	36
3.3.4.2. Ensaio de acumulação da RHO 123 em células Caco-2 pré- expostas às xantonas durante 24 h .....	38
3.3.5. Avaliação do efeito das xantonas na atividade ATPásica da P-gp .....	38
3.3.6. Avaliação do efeito das xantonas na citotoxicidade do Paraquato ...	40
3.3.7. Análise estatística.....	41
PARTE IV.....	43
4. Resultados e Discussão .....	45
4.1. Citotoxicidade das Xantonas – Ensaio de incorporação do vermelho neutro.....	45
4.2. Avaliação do efeito das xantonas na expressão da P-gp.....	47
4.3. Avaliação do efeito das xantonas na atividade da P-gp.....	48
4.4. Avaliação do efeito das xantonas na atividade ATPásica da P-gp .....	51



4.5. Efeitos protetores das Xantonas contra a toxicidade induzida pelo Paraquato .....	53
PARTE V.....	67
5. Conclusões.....	69
PARTE VI.....	71
6. Referências Bibliográficas .....	73



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo topológico da P-gp ilustrando as duas metades homólogas, cada uma com um domínio transmembranar (TMD – do inglês <i>transmembrane domain</i> ) contendo seis hélices transmembranares altamente hidrofóbicas (TMHs), e um domínio de ligação a nucleótidos (NBD) localizado no lado citoplasmático da membrana. Adaptado de [5, 18].	5
<b>Figura 2.</b> Modelos propostos para a compreensão do mecanismo de efluxo da Glicoproteína-P. A - Modelo Poroso; B - Modelo de Aspiração Hidrofóbica; C - Modelo Flipase. Adaptado de [28].	10
<b>Figura 3 -</b> Ciclo catalítico e de transporte da Glicoproteína-P – ciclo proposto de dimerização dos NBD induzido pelo ATP, oclusão e hidrólise do ATP, local de comutação de afinidade de ligação de nucleótidos e transporte de xenobióticos através da membrana. Adaptado de [1].	12
<b>Figura 4 -</b> Mecanismos de indução e ativação da P-gp. Adaptado de (4)	18
<b>Figura 5.</b> Estrutura base dos derivados xantônicos testados.	30
<b>Figura 6.</b> Esquema da contagem do número de células na câmara de Neubauer e respetiva equação de cálculo da densidade celular.	33
<b>Figura 7.</b> Citotoxicidade das xantonas AX1 - AX18 (0 - 50 $\mu$ M) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24 horas após a exposição.	46
<b>Figura 8.</b> Níveis de expressão da P-gp em células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (AXs 1-18, 20 $\mu$ M).	47
<b>Figura 9.</b> Atividade da P-gp em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de acumulação da RHO 123 na presença dos derivados xantônicos (AXs 1-18, 20 $\mu$ M) durante a fase de acumulação do substrato fluorescente da P-gp.	49
<b>Figura 10.</b> Atividade da P-gp em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de acumulação da RHO 123, 24 h após exposição ao derivados xantônicos (AXs 1-18, 20 $\mu$ M).	51
<b>Figura 11.</b> Atividade ATPásica da P-gp avaliada na presença dos derivados xantônicos (AXs grupo A, 20 $\mu$ M).	52
<b>Figura 12.</b> Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas para as experiências com os compostos do grupo A e do grupo B.	53

<b>Figura 13.</b> Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + AXs) das AXs testadas (20 µM). ....	56
<b>Figura 14.</b> Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + AXs) das AXs testadas (20 µM). ....	59
<b>Figura 15.</b> Citotoxicidade do Zosuquidar (1 e 10 µM) em células Caco – 2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24 horas após a exposição.....	62
<b>Figura 16.</b> Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + ZOS 10) de Zosuquidar 10 µM.....	63
<b>Figura 17.</b> A. Curvas concentração-resposta (morte celular) do PQ, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + ZOS 1) de ZOS 1 µM.B. Curvas concentração-resposta (morte celular) do PQ, obtidas com (PQ + ZOS 10, 1h) ou sem (PQ) pré-incubação com ZOS (10 µM), 1 h antes da exposição ao PQ. ....	65

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Diferentes classes de substratos da P-gp. Adaptado de [4].	8
<b>Tabela 2</b> - Classes de inibidores da P-gp. Adaptado de [18].	15
<b>Tabela 3</b> - Exemplos de indutores da P-gp. Adaptado de [18]	17
<b>Tabela 4</b> - Valores de EC <sub>50</sub> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo – morte celular), TOP (efeito máximo), BOTTOM (efeito mínimo) e Hill slope das curvas concentração-resposta ao PQ obtidas com (PQ + AXs) ou sem (PQ) exposição simultânea aos derivados xantônicos (20 µM).	57
<b>Tabela 5</b> - Valores de EC <sub>50</sub> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (efeito mínimo) e Hill slope das curvas concentração-resposta ao paraquato obtidas com (PQ + AXs) ou sem (PQ) exposição simultânea aos derivados xantônicos (20 µM).	61
<b>Tabela 6</b> - Valores de EC <sub>50</sub> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (efeito mínimo) e Hill slope das curvas concentração-resposta ao PQ obtidas com (PQ + ZOS) ou sem (PQ) exposição ao ZOS (1 e 10 µM).	66



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	- ATP <i>binding cassette</i>
ADP	- Difosfato de adenosina ( <i>adenosine diphosphate</i> )
AI	- Acumulação inibida
AN	- Acumulação normal
ATP	- Trifosfato de adenosina ( <i>adenosine triphosphate</i> )
AX	- Xantona
BHE	- Barreira hematoencefálica
CT	- Composto teste
CYP	- Citocromo P450
DEX	- Dexametasona
DMEM	- Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	- Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
FBS	- Soro bovino fetal ( <i>fetal bovine serum</i> )
HBSS	- <i>Hank's balanced salt solution</i>
HVC	- <i>Hydrofobic vacuum cleaner</i>
MDR	- <i>Multidrug resistance</i>
MIF	- Média de intensidade de fluorescência
NBD	- <i>Nucleotide binding domain</i>
NEAA	- Aminoácidos não essenciais ( <i>nonessential amino acids</i> )
NR	- Vermelho neutro ( <i>neutral red</i> )
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline solution</i>
PE	- Ficoeritrina ( <i>phycoerythrin</i> )
P-gp	- Glicoproteína P ( <i>P-glycoprotein</i> )
PKC	- <i>Protein kinase C</i>
PQ	- Paraquato
PXR	- <i>Pregnane X receptor</i>
QSAR	- <i>Quantitative structure-activity relationships</i>
RHO 123	- Rodamina 123 ( <i>rhodamine 123</i> )

SNC - Sistema nervoso central

TMD - *Transmembrane domain*

TMH - *Transmembrane  $\alpha$ -helice*

UV – Ultravioleta

ZOS - Zosuquidar



## **ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação está organizada em seis secções:

### **Parte I – Introdução geral sobre a Glicoproteína-P**

Nesta secção é apresentada uma revisão da literatura sobre a Glicoproteína-P, de modo a proporcionar uma boa base para compreender os objetivos e os resultados obtidos nos estudos experimentais realizados.

### **Parte II – Objetivos**

Nesta secção, encontram-se os objetivos gerais da presente dissertação.

### **Parte III – Secção experimental**

Nesta secção são descritas as metodologias laboratoriais realizadas no trabalho experimental, assim como o respetivo fundamento. Nesta secção inclui-se igualmente uma breve consideração sobre o modelo experimental *in vitro* e o modelo de substrato tóxico da Glicoproteína-P utilizados nos estudos laboratoriais.

### **Parte IV – Resultados e Discussão**

Nesta secção é efetuada a apresentação e discussão dos resultados obtidos no âmbito desta dissertação.

### **Parte V – Conclusões**

A parte IV inclui as principais conclusões retiradas no âmbito da presente dissertação, tendo por base o trabalho laboratorial e os resultados obtidos.

### **Parte VI – Referências**

Nesta última parte, encontram-se todas as referências utilizadas ao longo da dissertação



## PARTE I





## 1. INTRODUÇÃO

A superfamília de transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) representa uma das maiores famílias existentes com, pelo menos, 49 transportadores identificados no genoma humano, os quais desempenham um papel crucial na fisiologia celular, com alguns deles a exercer uma importante função no transporte de xenobióticos [2-5]. A superfamília ABC está dividida em 7 classes diferentes (A-G): ABCA (12 membros), ABCB (11 membros), ABCC (13 membros), ABCD (4 membros), ABCE (1 membro), ABCF (3 membros) e ABCG (5 membros), sendo que a Glicoproteína-P (P-gp do inglês P-glycoprotein) pertence à subfamília ABCB [3-5]. A P-gp (*MDR1/ABCB1*), conhecida como a proteína de resistência ao cancro da mama (*BCRP/ABCG2*) e os transportadores da família de proteínas associadas à multirresistência (*MRP/ABCC*) são os principais membros da família ABC implicados na eficácia terapêutica e toxicidade de fármacos e outros xenobióticos [5, 6]. No Homem, a P-gp é codificada por dois genes, o *MDR1/ABCB1* e o *MDR3/ABCB4* (ou *MDR2*) (do inglês MDR – *multidrug resistance*) [4, 7, 8], apesar de apenas o gene *mdr1* codificar para a isoforma da proteína intimamente associada ao fenómeno MDR. Por outro lado, a isoforma *mdr3* é responsável pela translocação dos fosfolípidos para a bile [5]. Já em roedores, a P-gp é codificada pelos genes *mdr1a* (*abcb1a*), *mdr1b* (*abcb1b*) e *mdr2* (*abcb4*), sendo que o fenótipo de MDR é promovido pelos genes *mdr1a* e *mdr1b* [9, 10].

Quando ocorre exposição a xenobióticos, ainda que durante um período de tempo curto, o gene *mdr1* é ativado conduzindo à indução do fenómeno de multirresistência a compostos química-, estrutural- e farmacologicamente muito distintos [5, 11].

### 1.1. A Glicoproteína-P

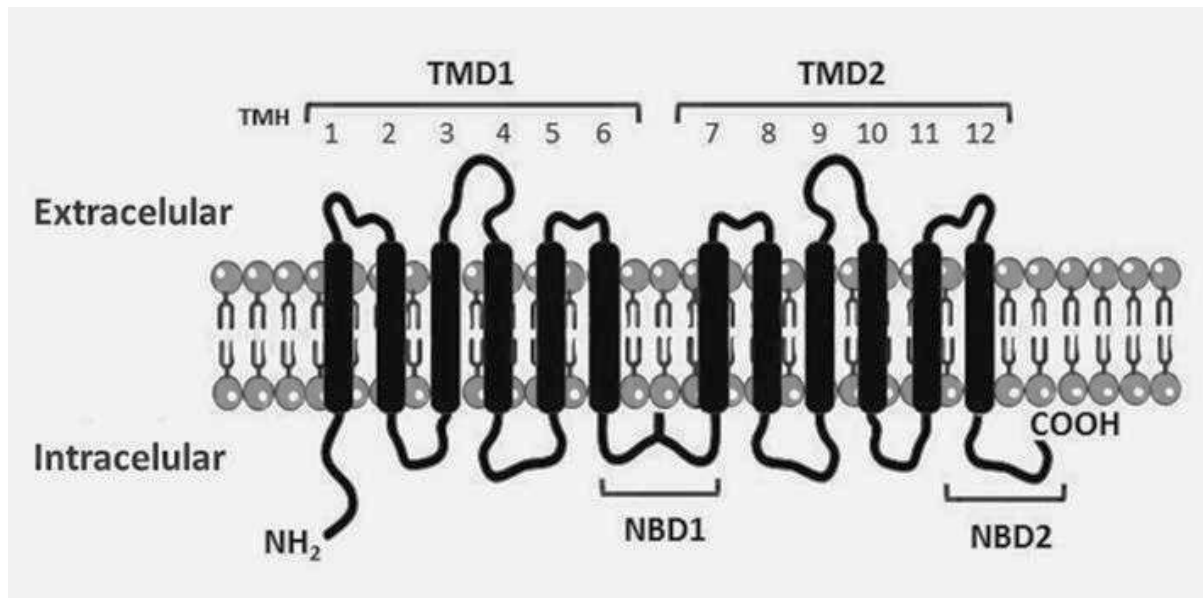
A descoberta da P-gp como glicoproteína de superfície deveu-se a Juliano e Ling, em 1976, devido à elevada expressão desta proteína em células do ovário de hamster chinês que demonstraram ser resistentes a fármacos [12]. A designação desta glicoproteína, glicoproteína-P, deve-se à sua função em termos de permeabilidade membranar [13] sendo, atualmente, uma das proteínas transportadoras mais estudadas e das quais existe mais conhecimento acerca das características e papel que desempenha [14].

#### 1.1.1. Estrutura

A P-gp é uma proteína de superfície de elevado peso molecular, 170 kDa, sintetizada no retículo endoplasmático, constituída por 1280 aminoácidos, dispostos em duas porções homólogas de 610 aminoácidos, unidas por uma região de ligação citoplasmática altamente carregada onde constam 60 aminoácidos [4, 5, 8]. Cada porção é constituída por seis domínios transmembranares hidrofóbicos (TMHs – do inglês *transmembrane  $\alpha$ -helices*) e um domínio intracitoplasmático hidrofóbico, local onde vai ocorrer a ligação a nucleótidos (NBD – *nucleotide binding domain*), nomeadamente a ligação e hidrólise do ATP (do inglês *adenosine triphosphate*), de modo a permitir gerar a energia necessária para que o transporte se realize (**Figura 1**) [4, 5, 11].

As TMH's compõem o percurso através do qual ocorre a passagem, pelas membranas celulares, de vários xenobióticos estruturalmente não relacionados, conferindo assim a proteção necessária para os lípidos que compõem a bicamada uma vez que proporciona uma via hidrofílica de passagem ao nível das membranas celulares [8, 15]. Por outro lado, cada NBD é composto por duas regiões - Motivo Walker A e Motivo Walker B -, as quais são encontradas em diversas proteínas com as funções de ligação e hidrólise do ATP. Existe ainda um Motivo C, único na superfamília ABC, e que se situa entre os dois anteriores [5, 8, 11, 16]. Existe um resíduo de lisina ligado ao Motivo Walker A, responsável pela sua ligação ao grupo fosfato do ATP. No Motivo Walker B, existe um resíduo de ácido aspártico

responsável pela interação com o  $Mg^{2+}$  [17]. Estas três regiões atuam diretamente na ligação e hidrólise de nucleótidos [8, 17].



**Figura 1.** Modelo topológico da P-gp ilustrando as duas metades homólogas, cada uma com um domínio transmembranar (TMD – do inglês *transmembrane domain*) contendo seis hélices transmembranares altamente hidrofóbicas (TMHs), e um domínio de ligação a nucleótidos (NBD) localizado no lado citoplasmático da membrana. Adaptado de [5, 18].

### 1.1.2. Distribuição tecidual e papel fisiológico

A P-gp apresenta uma ampla distribuição tecidual, motivo pelo qual a sua grande capacidade de reconhecimento de compostos está intimamente relacionada com a alteração da biodisponibilidade de compostos reconhecidos como seus substratos. Esta proteína atua como barreira fisiológica expulsando xenobióticos e toxinas para o exterior das células, fenômeno que permite que diversos compostos apresentem uma biodisponibilidade extensivamente reduzida uma vez que este é um processo desencadeado pela atividade de efluxo de sistemas transportadores que se encontram, por exemplo, no epitélio intestinal, como é o caso da P-gp [7, 11, 19, 20]. A localização/expressão da P-gp é seletiva. Ocorre no local de entrada dos compostos nos tecidos como é o caso das células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE), células dos canalículos biliares, células epiteliais dos

túbulos proximais renais, sendo a membrana apical das células do epitélio intestinal um dos locais com expressão mais evidenciada.

Ao nível da BHE, a P-gp restringe o acesso de determinados xenobióticos ao sistema nervoso central (SNC) [18]. No que diz respeito ao fígado, a P-gp, expressa-se nas membranas caniculares dos hepatócitos e células da vesícula biliar promovendo a passagem de compostos para a bile ou corrente sanguínea [17, 21, 22]. A expressão da P-gp nas células epiteliais dos túbulos proximais é essencial para o controlo do efluxo de diversos compostos para a urina principalmente se se tratarem de moléculas hidrofóbicas [23-25].

Ao nível do trato gastrointestinal, esta proteína transportadora apresenta elevada expressão na superfície apical dos enterócitos e nas células intestinais, variando ao longo do lúmen intestinal, o que explica a passagem de certos compostos e metabolitos para a circulação, impedindo assim a sua acumulação no organismo e limitando a absorção para os enterócitos [17, 21, 22, 26].

A sua expressão intestinal é, assim, um fator determinante a ter em consideração no que respeita à administração oral de diversos fármacos, uma vez que pode modificar a extensão da absorção e, consequentemente, a biodisponibilidade desses compostos, fazendo desta uma das principais vias de destoxificação [20, 27-30].

O papel da P-gp na biodisponibilidade de xenobióticos foi demonstrado em estudos realizados em humanos, nos quais a administração de um inibidor da P-gp antes da administração oral de um substrato da P-gp (morfina) culminou numa reduzida atividade desta proteína, o que promoveu um aumento dos níveis plasmáticos de morfina e, consequentemente, num aumento da sua biodisponibilidade [21, 27]. Por outro lado, um aumento da expressão da P-gp pode conduzir à falha terapêutica de fármacos que são substratos desta proteína de transporte [8, 27]. Existem outros locais de expressão da P-gp nos quais esta proteína exerce essencialmente papel protetor, nomeadamente ao nível do endométrio de mulheres grávidas e da placenta [18, 31], medula óssea, linfócitos T CD3+, CD4+, CD56+, CD8+ [30, 32-34] e células endoteliais capilares da cóclea e do vestíbulo desempenhando um papel protetor na barreira sangue-ouvido interno [18].



Esta função da P-gp ao nível da fase III da farmacocinética está intimamente relacionada com o facto da proteína ser expressa em locais que desempenham função excretora, nomeadamente ao nível superfície apical das células epiteliais do intestino grosso e delgado, dos dutos biliares do fígado e dos túbulos proximais do rim [5, 26].

### **1.1.3. Substratos e mecanismos de efluxo**

#### **1.1.3.1. Substratos da P-gp**

Dada a sua função como bomba de efluxo, a P-gp interage com uma elevada diversidade de compostos hidrofóbicos e fracamente hidrofílicos, estrutural e farmacologicamente diferentes como hormonas esteroides, agentes anticancerígenos, agentes quimioterápicos, agentes imunossuppressores, bloqueadores dos canais de cálcio,  $\beta$ -bloqueadores, pesticidas, entre outros (**Tabela 1**) [4, 5, 11, 35]. Estes compostos, também designados como substratos da P-gp contêm anéis aromáticos e um átomo de azoto carregado positivamente, variando em tamanho, estrutura e função, os quais entram nas células por difusão passiva [5, 8, 16, 20, 36].

**Tabela 1** - Diferentes classes de substratos da P-gp. Adaptado de [4].

CLASSE	EXEMPLOS
<b>Analgésicos opióides</b>	Morfina, Pentazocina, Fentanilo
<b>Antiarrítmicos</b>	Quinidina, Verapamilo, Digoxina
<b>Agentes anticancerígenos</b>	<b>Antibióticos</b> - Antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina), Actinomicinas (actinomicina D), Mitomicina C, Mitoxantrona <b>Antimetabolitos</b> - Metotrexato, Citarabina, 5-fluorouracilo, Hidroxiureia <b>Taxanos</b> - Paclitaxel, Docetaxel <b>Vinca alcalóides</b> - Vinblastina, Vincristina <b>Agentes alquilantes</b> - Clorambucil, Cisplatina <b>Inibidores da tirosina cinase</b> - Mesilato de Imatinibe, Gefitinibe <b>Outros</b> - Tamoxifeno, Bisantreno
<b>Antidepressivos</b>	Amitriptilina, Nortriptilina, Doxepina
<b>Agentes anti-diarreicos</b>	Loperamida, Octreotida
<b>Antieméticos</b>	Ondansetron, Domperidona
<b>Antiepilépticos e Anticonvulsivantes</b>	Topiramato, Fenitoína, Carbamazepina, Fenobarbital
<b>Agentes antigota</b>	Colchicina
<b>Antihelmínticos</b>	Ivermectina
<b>Antihistamínicos</b>	Terfenadina, Fexofenadina
<b>Antivíricos</b>	Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Amprenavir, Indinavir
<b>Antihipertensores</b>	Reserpina, Debrisoquina, Celiprolol, losartan, Talinolol, Prazosina
<b>Agentes antimicrobianos</b>	Eritromicina, Doxiciclina, Itraconazol, Cetoconazol, Levofloxacina, Rifampicina, Esparfloxacina, Tetraciclina, Grepafloxacina, Claritromicina, Gramicidina A, Valinomicina
<b>Bloqueadores dos canais de cálcio</b>	Nifedipina, Diltiazem, Verapamilo, Azidopina, Nicardipina
<b>Antagonistas da Calmodulina</b>	Trifluoperazina, Trans-flupentixol
<b>Glicosídeos cardíacos</b>	Digoxina, Digitoxina
<b>Agentes redutores do colesterol</b>	Lovastatina, Simvastatina
<b>Corantes fluorescentes</b>	Rodamina 123, Hoechst 33342, Calceína AM (calceína acetoxometilester)
<b>Antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> da Histamina</b>	Cimetidina, Ranitidina
<b>Imunossupressores</b>	Ciclosporina A, Tacrolimus, Sirolimus, Valspodar
<b>Produtos naturais</b>	Flavonóides, Curcuminóides
<b>Neurolépticos</b>	Clorpromazina, Fenotiazina
<b>Pesticidas</b>	Metilparatíção, Endosulfan, Paraquato
<b>Hormonas esteróides</b>	Aldosterona, Corticosterona, Dexametasona, Cortisol, Metilprednisolona

Dados compilados a partir de [21, 37-39]

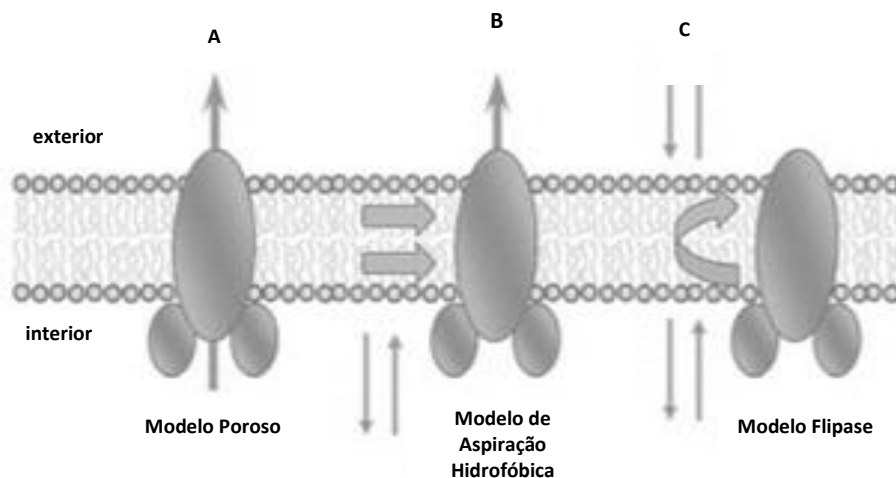
### 1.1.3.2. Mecanismo de Efluxo

Dada a indefinição que existe relativamente ao local de interação entre o substrato e a P-gp, vários modelos têm sido propostos para descrever o mecanismo de efluxo mediado por esta proteína [4, 28]. São três os modelos, mais aceitáveis, que explicam o mecanismo de extrusão de xenobióticos levado a cabo pela P-gp: o modelo poroso, o modelo flipase e o modelo de aspiração hidrofóbica (HVC, do

inglês *hydrofobic vacuum cleaner*), sendo os dois últimos modelos os que apresentam maior concordância com a estrutura terciária da P-gp, demonstrando que os substratos conseguem aceder ao local de ligação da proteína a partir da camada lipídica (**Figura 2**) [4, 5, 28].

Proposto por Gottesman e Pastan em 1993, o modelo alvo de maior aceitação tem sido o HVC, demonstrando que a P-gp reconhece os substratos que se incorporam na parte interna da membrana plasmática, transportando-os por um canal proteico para o meio extracelular, conferindo proteção à célula de moléculas potencialmente tóxicas [10, 18, 40]. No caso de ausência de nucleótidos, as TMHs formam um único canal com um poro central que se encontra aberto para a superfície extracelular estendendo-se na profundidade da membrana, enquanto que após a ligação aos nucleótidos, as TMHs organizam-se em três domínios que se abrem para o poro central ao longo do seu comprimento, facilitando o acesso de xenobióticos/substratos com características hidrofóbicas diretamente da bicamada fosfolipídica para o poro central do transportador [10, 18, 40]. Esta ação origina um gradiente de concentração através da membrana plasmática com uma concentração mais elevada do composto na parte externa. Os substratos acedem aos seus locais de ligação através de *gates* formadas entre as TMHs 5/8 e 2/11 [4, 26, 28, 41].

Outro dos modelos, o modelo flipase descrito por Higgins e Gottesman em 1992, postula que os substratos lipofílicos são detetados pela P-gp no folheto interno da membrana plasmática e, posteriormente, translocados para o folheto externo por difusão passiva ou diretamente para o espaço extracelular [40].



**Figura 2.** Modelos propostos para a compreensão do mecanismo de efluxo da Glicoproteína-P. **A** - Modelo Poroso; **B** - Modelo de Aspiração Hidrofóbica; **C** - Modelo Flipase. Adaptado de [28].

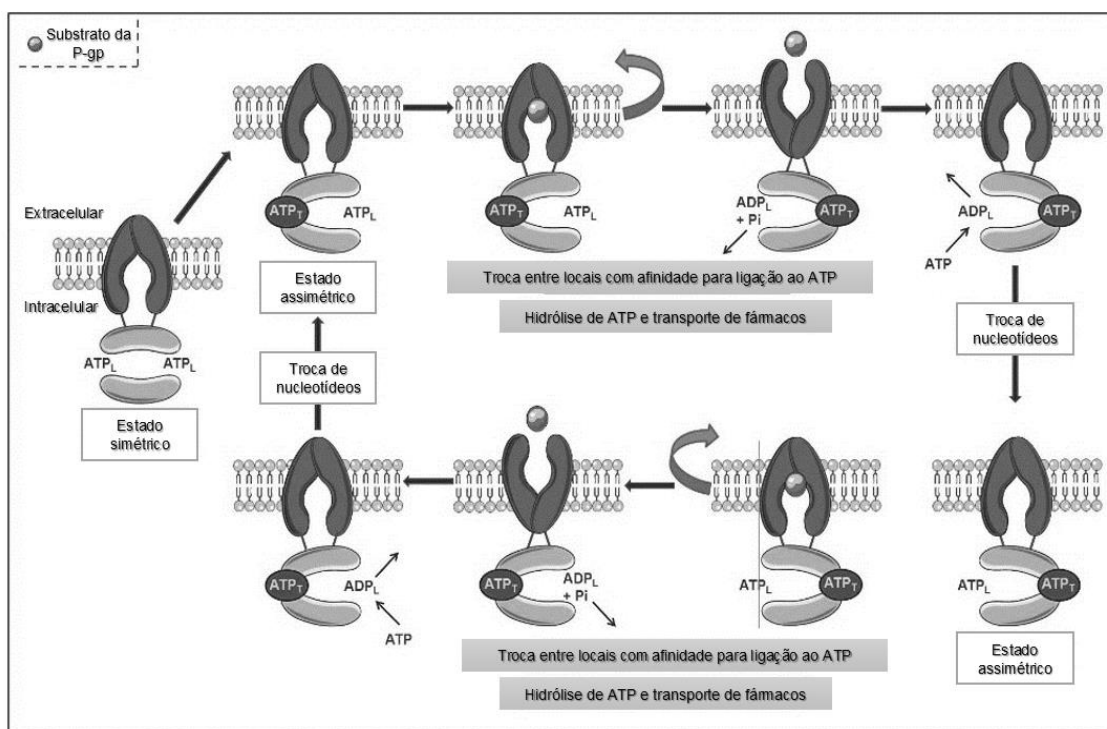
#### 1.1.3.3. Ciclo catalítico e de transporte

Os NBDs das proteínas da superfamília ABC contêm três motivos altamente conservados que desempenham um papel crítico na ligação e hidrólise do ATP e, consequentemente, no ciclo catalítico da P-gp – o Motivo Walker A, o Motivo Walker B, e um terceiro Motivo denominado “Assinatura C”. Cada sítio de ligação ao ATP é formado pelos motivos Walker A, Walker B de uma das subunidades NBD e por um motivo “Assinatura C” de uma subunidade NBD “vizinha”. Desta forma, existem duas moléculas de ATP na interface do dímero formando uma estrutura de “sandwich dímer” [2, 17, 18, 37].

Quando ocorre ligação ao substrato, a atividade ATPásica da P-gp é aumentada até 3 ou 4 vezes mais, podendo chegar até 20 vezes mais. A atividade ATPásica induzida pelo substrato é frequentemente bifásica: com estimulação perante concentrações baixas de substrato e inibição perante concentrações elevadas [18]. Mais recentemente foi relatado que a taxa de efluxo do substrato e o aumento associado da atividade ATPásica da P-gp estão correlacionados com as ligações de hidrogénio entre a P-gp e o substrato, ou seja, em casos em que existam poucas ligações de hidrogénio entre o substrato e a P-gp existe uma taxa de transporte mais elevada; em casos em que haja uma ligação de hidrogénio mais extensa, a taxa de transporte será mais baixa [4]. Como já referido, os processos

de ligação e hidrólise do ATP são de extrema importância para a função de bomba de efluxo da P-gp, na qual por cada molécula de substrato transportada, são hidrolisadas duas de ATP [40]. Nem sempre foi esta a proporção apresentada neste transporte já que nas primeiras experiências, em 1993, no mínimo 50 moléculas de ATP eram hidrolisadas por cada molécula de substrato transportada [4, 41]. No entanto, esta quantidade foi revista para duas moléculas de ATP [4].

O ciclo catalítico da P-gp subdivide-se em duas etapas. Inicialmente o xenobiótico e o ATP ligam-se à P-gp nos locais específicos para a ligação, onde ocorre hidrólise dos nucleótidos, originando ADP (do inglês adenosine diphosphate) e libertando a energia necessária ao efluxo do xenobiótico, terminando assim a primeira etapa. Nesta primeira etapa ocorre indução da alteração conformacional da estrutura terciária da P-gp, aproximando os TMHs 1 e 11. Esta alteração conformacional da P-gp provoca diminuição da afinidade quer para o substrato quer para os nucleótidos [40]. A segunda etapa inicia-se pela hidrólise de outra molécula de ATP, a qual liberta a energia necessária para que a proteína volte à sua conformação original. Desta forma fica completo o ciclo catalítico com a proteína novamente no seu estado original e pronta a iniciar outro ciclo (**Figura 3**).



**Figura 3** - Ciclo catalítico e de transporte da Glicoproteína-P – ciclo proposto de dimerização dos NBD induzido pelo ATP, oclusão e hidrólise do ATP, local de comutação de afinidade de ligação de nucleotídeos e transporte de xenobióticos através da membrana. Adaptado de [1].

#### 1.1.4. Modulação da P-gp

##### 1.1.4.1. Mecanismos de Inibição e Inibidores

Entende-se o fenômeno MDR como um mecanismo no qual células neoplásicas expostas a um determinado fármaco desenvolvem resistência a outros fármacos com estrutura e função diferente das do fármaco a que estiveram inicialmente expostas. Esta compreensão serve de ponto de partida para o desenvolvimento de compostos que atuem ao nível da indução do mecanismo de efluxo, da alteração da expressão ou função das proteínas alvo, da indução das vias de destoxificação, reparação do DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) e alterações na via sinalizadora da apoptose, visto estes serem processos fulcrais para o desenvolvimento de resistências [5, 42].

O processo de inibição da P-gp tem como principal objetivo a redução da função excretora, o que por sua vez conduz ao aumento da concentração do fármaco no local alvo, de forma a potenciar o efeito farmacológico desejável quando

assim se pretende. Deste efeito surge a necessidade contínua de desenvolver moléculas com características inibitórias da P-gp, sendo que alguns destes compostos se apresentam promissores na reversão do processo MDR [28, 43].

Os mecanismos de inibição da P-gp conhecidos são: i) inibição competitiva, não competitiva ou alostérica dos locais de ligação que bloqueiam o transporte dos substratos; ii) interferência ao nível da hidrólise do ATP; e iii) alteração da integridade da bicamada fosfolipídica da membrana. Qualquer um destes processos tem como finalidade melhorar a biodisponibilidade e a absorção dos fármacos de modo a que a sua ação terapêutica tenha um maior sucesso [7, 29, 44].

Atualmente existem quatro gerações de inibidores da P-gp (**Tabela 2**), as quais são classificadas com base nas propriedades dos seus compostos nomeadamente especificidade, afinidade e toxicidade. Estes compostos podem também ser usados como agentes terapêuticos [5, 28, 29]. Como inibidores de primeira geração, incluem-se compostos farmacologicamente ativos que foram desenvolvidos para outras indicações, por vezes com propriedades terapêuticas para uso clínico além da capacidade já conhecida de inibição da P-gp. Bloqueadores dos canais de cálcio (Verapamilo), imunossupressores (Ciclosporina A), antihipertensores (Reserpina) e antiestrogénios (Tamoxifeno) são as principais classes de compostos pertencentes aos inibidores de primeira geração. A utilização destes compostos como inibidores da P-gp está severamente condicionada pela sua toxicidade, uma vez que por vezes torna-se necessária a administração de dosagens elevadas para atingir o efeito pretendido. No sentido de contornar a toxicidade associada a estes compostos, houve uma maior necessidade de pesquisa culminando assim no desenvolvimento de inibidores de segunda e terceira geração [4, 5, 28]. Os inibidores de segunda geração são análogos estruturais dos inibidores de primeira geração, incluindo o dexverapamilo (R-isómero do verapamilo) e o valspodar (análogo da Ciclosporina D), os quais, ao contrário dos inibidores de primeira geração já mencionados, não possuem atividade farmacológica, apresentando no entanto uma maior afinidade para a P-gp [28]. O seu desenvolvimento com uma reduzida ação farmacológica foi premente para limitar a possível toxicidade associada à sua utilização. Tanto os inibidores de primeira geração como os de segunda apresentam falta de especificidade,

traduzindo-se na inibição de dois ou mais transportadores da família ABC [4]. Dada a falta de especificidade para a P-gp dos inibidores de primeira e segunda geração, e para ultrapassar as diversas limitações desses inibidores, foram desenvolvidos inibidores de terceira geração com base, por exemplo, em estudos de QSAR (*quantitative structure-activity relationships*). Assim, os inibidores de terceira geração apresentam como principal objetivo melhorar o tratamento de tumores resistentes a fármacos, além da inibição da P-gp, e as principais características associadas a estes compostos são a elevada especificidade e toxicidade. Dentro desta categoria de inibidores encontram-se o zosuquidar (LY335979), OC144093 e o tariquidar (XR9576), cuja potência é dez vezes superior à dos inibidores de segunda geração, sendo necessário concentrações muito reduzidas para inibir a P-gp [4, 28]. Mais recentemente, surgiu outra geração de inibidores – a quarta geração – a qual inclui compostos obtidos para as mais variadas aplicações como, por exemplo, lípidos, surfactantes, péptidos, compostos naturais e derivados, entre outros, que atuam ao nível da alteração dos lípidos da membrana bloqueando a função da P-gp [11, 29, 42].



**Tabela 2** - Classes de inibidores da P-gp. Adaptado de [18].

<b>CLASSE</b>	<b>EXEMPLOS</b>
<b>PRIMEIRA GERAÇÃO</b>	
<i>Analgésicos</i>	Meperidina, Pentazocina
<i>Anestésicos</i>	Clorofórmio, Álcool benzílico, Éter dietílico, Propofol
<i>Antibióticos</i>	Cefoperazona, Ceftriaxona, Salinomina, Eritromicina, Azitromicina
<i>Anticancerígenos</i>	Tamoxifeno, Bicalutamida, Mitotano, Gefitinib, Lapatinibe, Erlotinibe, Vinblastina
<i>Antifúngicos</i>	Itraconazol, Cetoconazol, Econazol, Hidro Ptychantol A, Aureobasidina A
<i>Antihistamínicos</i>	Benzquinamida, Azelastine, Tesmilifeno, Astemizol, Terfenadina
<i>Antiinflamatórios</i>	Zomepirac, Indometacina, SC236, Curcumina, Ibuprofeno, NS-398
<i>Antidepressivos</i>	Amoxapina, Loxapina, Sertralina, Paroxetina, Fluoxetina
<i>Antimaláricos</i>	Quinino
<i>Antiprotozoários</i>	Hicantona, Monensina, Metronidazol
<i>Antivirais</i>	Concanamicina A, Ritonavir, Nelfinavir, Saquinavir
<i>Ansiolíticos e sedativos-hipnóticos</i>	Midazolam
<i>Fármacos cardíacos</i>	<b>Antiarrítmicos:</b> Amiodarona, Propafenona, Quinidina <b>Bloqueadores dos canais de cálcio:</b> Verapamilo, Dexverapamilo, Emopamilo, Lomerizina, Tetrandrina, Mibefradilo, Diltiazem, Bepridilo <b>Antiplaquetários:</b> Dipiridamole <b>Antihipertensores:</b> Reserpina, Prazosina, Doxazosina, Carvedilol
<i>Estimuladores do SNC</i>	Cafeína, Pentoxifilina, Nicotina, Cotinina
<i>Fármacos para baixar o colesterol</i>	Atorvastatina
<i>Imunossuppressores</i>	Ciclosporina A, Tacrolimus, Sirolimus
<i>Neurolépticos e antipsicóticos</i>	Trans(E)-Flupentixol, Perfenazina, Proclorpromazina, Clorpromazina, Trifluoperazina, Pirospirona, Haloperidol
<i>Inibidores da fosfodiesterase</i>	Vardenafila
<i>Hormonas esteróides</i>	Progesterona, Medroxiprogesterona, Cortisol, Metilprednisolona, Medroxiprogesterona 17-acetato, Mifepristona, Tirilazad
<i>Outros</i>	Tetrabenazina, Bromocriptina, Disulfiram, Metadona
<b>SEGUNDA GERAÇÃO</b>	Dexverapamilo, Dexniguldipina, Cinchonina, Hidrocinchonina, Quinina homodímero Q2, Valspodar, Biricodar, Timcodar, Toremifeno, Dofequidar, Estipiamida homodímero,
<b>TERCEIRA GERAÇÃO</b>	Zosuquidar, Tariquidar, Elacridar, Laniquidar
<b>QUARTA GERAÇÃO</b>	
<i>Produtos naturais</i>	<b>Flavonóides, Alcalóides, Cumarinas, Canabinóides, Tacalonolides, Diterpenos, Sesquiterpenos, Triterpenos, Ginsenosídeos, Polienos, Lignanas</b>
<i>Peptidomiméticos</i>	Reversin 121, Reversin 205, Peptídeo 15
<i>Surfactantes e lípidos</i>	Pluronic P85, Tween-20, Triton X-100, Cremophor EL
<i>Ligantes duplos</i>	Inibidores duplos da P-gp e do crescimento de células tumorais (tioantonas aminadas)

Dados compilados a partir de [21, 37-39, 42]

#### 1.1.4.2. Mecanismos de Indução e Indutores

Está claramente estabelecido o importante papel de proteção desencadeado pela P-gp em tecidos expostos a compostos potencialmente tóxicos uma vez que este juntamente com outros fatores como aumento da concentração de composto em células neoplásicas e elevada expressão da P-gp conduzem ao fenómeno MDR por ativação do gene *MDR1* [21, 40]. Como será abordado a seguir, a P-gp

desempenha também um importante papel de proteção em duas áreas de grande relevância nomeadamente as interações entre fármacos mediadas pela P-gp e o desenvolvimento de multirresistências por parte das células neoplásicas a agentes quimioterápicos [7].

O mecanismo de indução desta proteína resulta de um aumento dos níveis de mRNA do gene *MDR1*, o que está associado a processos como o aumento da transcrição do gene ou a sua amplificação [3, 4]. Estes processos potenciam a diminuição intracelular da concentração de xenobióticos, podendo, assim, sugerir-se a indução da P-gp como uma potencial via de atenuação ou prevenção da toxicidade dos seus substratos tóxicos [4, 46].

São vários os fatores de transcrição implícitos na expressão do gene *mdr1* [4]. No entanto, diversos estudos têm demonstrado a intervenção especial do “*pregnane X receptor*” (PXR), um recetor nuclear identificado como regulador major da indução da P-gp e que é expresso no fígado e intestino delgado, assim como em diversos tecidos neoplásicos [47]. O PXR é ativado por uma variedade de ligandos estruturalmente não relacionados (rifampicina, hiperforina e o anticancerígeno paclitaxel), podendo outros fármacos amplamente utilizados na terapia anticancerígena também ativarem a indução da P-gp por um mecanismo mediado pelo PXR e, dessa forma, podendo promover o fenómeno MDR em células cancerígenas e a diminuição intracelular fármacos anticancerígenos [47].

São vários os compostos capazes de promover a indução da P-gp como é o caso da fenitoína, rifampicina, dexametasona, compostos presentes em extratos de erva de S. João (hipericão), agentes quimioterápicos, como doxorrubicina e vinblastina, entre outros (**Tabela 3**) [4, 7]. Além dos compostos anteriormente referidos, também fatores ambientais como o choque térmico, radiação ultravioleta (UV), raios-X, entre outros, podem promover a indução da P-gp [3, 4, 7].

Dos indutores anteriormente referidos, a dexametasona (DEX), um corticosteroide sintético, foi testado com sucesso em intoxicações por paraquato (PQ) devido às suas propriedades antiinflamatórias aliadas à sua capacidade de promover a síntese *de novo* da P-gp, conduzindo assim a uma maior eliminação do PQ dos pulmões e, conseqüentemente, ao aumento da sua excreção fecal [48, 49].

**Tabela 3** - Exemplos de indutores da P-gp. Adaptado de [18]

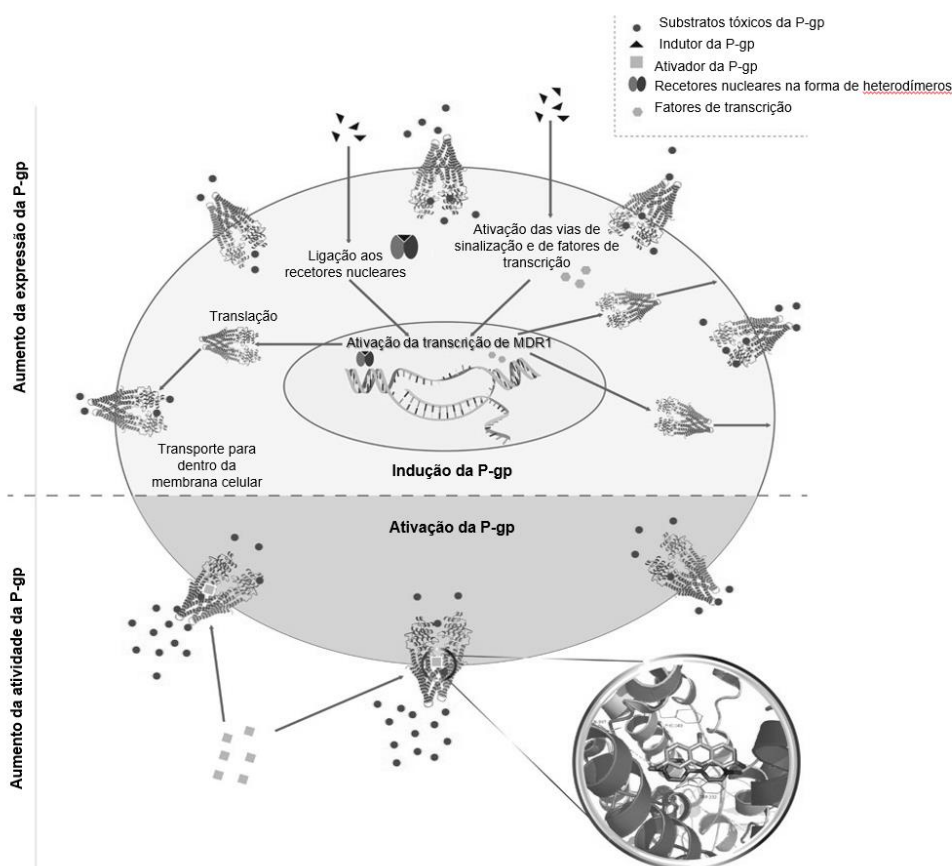
INDUTORES				
Abacavir	Colato	Epigallocatequina-3-galato	Mifepristona	Rescinamina
N-acetoxi-2-acetilaminofluoreno	Crisina	Epirubicina	Mitoxantrona	Reserpina
2-Acetilaminofluoreno	Ciclesonida	Eriodictiol	Morfina	Ácido retinóico
Actinomicina D	Cisplatina	Eritromicina	MX2	Rinacantina-C
Aflatoxina B1	Clotrimazol	$\beta$ -Estradiol	Miricetina	Rifampicina
Aldosterona	Colchicina	Etinilestradiol	Naringenina	Rilpivirina
Ambrisentan	Corticosterona	Fenbufeno	Nefazodona	Saquinavir
Amiodarona	Extratos de Curcuma	Flavona	Nelfinavir	Pequenas moléculas inibidoras da tirosina cinase
Amprenavir	Curcumina	5-Fluorouracil	Nevirapina	Sildenafil
<i>m</i> -Amsacrina	Cianidina	Flutamida	N-hidroxi-2-(acetilamino)fluoreno	Arsenito de sódio
Apigenina	Cicloheximida	Fluticasona	Nicardipina	Butirato de sódio
Artemisinina	Ciclofosfamida	Genisteína	Nifedipina	Espironolactona
Ácido asiático	Ciclosporina A	<i>Ginkgolides</i> A e B	Nimesulida	Tetraetilo 2-(3,5-di-terc-butil-4-hidroxifenil) etenil-1,1-bisfosfonato
Atazanavir	Citarabina	Hidroxiureia	<i>Noratiriol</i>	Sulindac
Atorvastatina	Daidzeína	Hiperforina	Oleocantal	Tacrolimus
Avermectina	Daunorrubicina	Hipericina	Oxicodona	Tadalafil
Beclometasona	Daurunavir	Extrato de Hipericação	Paclitaxel	Tamoxifeno
Benzo(a)pireno	Depsipeptídeo	Idarrubicina	Partenolide	Tangeretina
Benzo(e)pireno	Desvenlafaxina	Ifosfamida	Pentilenotetrazol	Taurocolato
Berberina	Dexametasona	Indinavir	Fenobarbital	Taxifolina
Betametasona	Diclofenac	Indometacina	Fenotiazina	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
Bilirrubina	Digoxina	Insulina	Fenitoína	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
Bosentan	Xantonas Dihidroxiladas	Isosafrol	Piperina	Tetra-hidrocurcumina
Bromocriptina	1 $\alpha$ ,25-Dihidroxitamina D3	<i>Isoxanthohumol</i>	Fator de ativação plaquetária	Derivados tioxantônicos
Budesonida	Diltiazem	Ivermectina	Prednisolona	$\gamma$ -Tocotrienol
Cafeína	Dimetilformamida	Lopinavir	5 $\beta$ -Pregnane-3,20-diona	Trazodona
Cloreto de Cádmio	Pregnenolona 6,16 $\alpha$ -dimetil	LY191401	Pregnenolona-16 $\alpha$ -carbonitrilo	<i>Triactyloleandomycin</i>
Capsaicina	Dimetilsulfóxido	Mangiferina	Probenecida	Tricostatina A
Carbamazepina	Docetaxel	Meloxicam	Propranolol	<i>Trimethoxybenzoylyohimbine</i>
Catequina	Doxorrubicina	Aripirazol	Quercetina	Venlafaxina
Celiprolol	Doxiciclina	Metotrexato	Quinidina	Verapamilo
Cembratrieno	Efavirenz	Metilprednisolona	Rapamicina ou Sirolimus	Vinblastina
<i>R</i> -Cetirizina	Emetina	Midazolam	Derivados reduzidos da rifampicina	Vincristina
Clorambucil				

### 1.1.4.3. Mecanismo de Ativação e Ativadores

Existe um novo grupo de compostos, descoberto recentemente, que interage com a P-gp, apresentando a capacidade de promover um aumento rápido da atividade deste transportador sem, no entanto, aumentar a sua expressão. Trata-se de uma classe designada por ativadores da P-gp [5, 45].

O mecanismo pelo qual os compostos ativadores da P-gp atuam é através da promoção de uma alteração conformacional da P-gp decorrente da sua ligação ao transportador o que, conseqüentemente, promove o transporte do substrato ligado a outro local de ligação (**Figura 4**). Isto sugere que a P-gp tem pelo menos dois locais de ligação [5, 19].

A ativação da P-gp torna-se assim um mecanismo mais rápido do que a indução em que a expressão se mantém inalterada e, ao mesmo tempo, mostra-se um mecanismo promissor para implementação de uma potencial terapêutica antidotal em casos em que ocorram intoxicações acidentais ou voluntárias com substratos da P-gp [5, 19].



**Figura 4** - Mecanismos de indução e ativação da P-gp. Adaptado de [4].

### **1.1.5. Mecanismos de indução/ativação como possível estratégia em intoxicações por substratos tóxicos da P-gp**

#### **1.1.5.1. Estudos *in vivo* e *in vitro***

Ao longo deste trabalho, tem sido referido diversas vezes o importante papel protetor desempenhado pela P-gp devido à sua expressão em diversos tecidos barreira e à sua afinidade para um vasto número de substratos. Por estas razões, exerce a sua capacidade como bomba de efluxo atuando de modo a promover a proteção contra substratos que possam ser tóxicos [5].

Já foram realizados estudos, *in vivo* e *in vitro*, com o objetivo de validar o papel protetor da P-gp na redução da concentração intracelular dos seus substratos, usando o PQ como modelo de substrato tóxico da P-gp, à semelhança do que foi realizado no âmbito do presente trabalho.

O PQ, 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto, é um potente herbicida não seletivo, tendo sido utilizado em larga escala em todo o mundo, principalmente em países asiáticos devido à sua ação de dessecação rápida. Após o contacto com as plantas, e na presença de luz, o PQ penetra rapidamente desidratando as partes verdes das plantas através da formação de radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) sendo que a sua destoxificação ocorre pela enzima superóxido dismutase, conduzindo à formação de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) [46, 47]. Nas últimas duas décadas tem-se verificado um aumento assustador das intoxicações por PQ na China, quer intencionais quer acidentais, as quais ocorrem maioritariamente por via oral. Em seres humanos, o PQ é responsável por danos irreversíveis em diferentes órgãos, principalmente a nível pulmonar, onde se acumula atingindo concentrações que podem ser até 10x mais elevadas do que no plasma [46, 48-50]. A gravidade das intoxicações provocadas por este herbicida, aliada à inexistência de um antídoto eficaz, potenciou a realização de diversos estudos.

Em estudos *in vivo* realizados em ratos Wistar, observou-se que uma única dose de dexametasona (100 mg/kg i.p.) 2 h antes da intoxicação com PQ (25 mg/kg ip) era suficiente para promover a indução da síntese *de novo* da síntese da P-gp a nível pulmonar [51], diminuindo assim a absorção intestinal do PQ e consequentemente, reduzindo os efeitos tóxicos associados ao herbicida. Este mecanismo permitiu uma redução da acumulação pulmonar de PQ em cerca de

40%, juntamente com uma diminuição do dano pulmonar e da peroxidação lipídica, contribuindo, assim, para um aumento da taxa de sobrevivência dos animais. Estes resultados fazem com que o mecanismo de indução da P-gp seja considerado uma estratégia bem sucedida em casos de intoxicação por PQ [52]. Resultados obtidos em estudos *in vitro* foram concordantes com os obtidos *in vivo* utilizando diferentes linhas celulares. Nos estudos realizados *in vitro*, foram utilizadas as células Caco-2 como modelo intestinal, as quais foram expostas a diferentes concentrações de doxorrubicina (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) e de hipericina (0 - 10  $\mu\text{M}$ ), durante 24, 48 e 72 h [53, 54]. Nesses estudos, os dois compostos aumentaram a expressão e atividade da P-gp de modo dependente do tempo e da concentração testada. Contudo, no caso da doxorrubicina, o aumento induzido na expressão da P-gp não resultou num aumento proporcional na sua atividade. Estes resultados alertam para a importância da determinação simultânea dos efeitos dos compostos na expressão e na atividade desta bomba de efluxo uma vez que um aumento no primeiro parâmetro pode não se refletir num aumento no segundo. Nestes estudos realizados *in vitro*, o modelo utilizado de substrato tóxico da P-gp foi também o PQ, tendo sido igualmente demonstrado que a pré-incubação das células com os dois indutores já referidos, antes da exposição das células ao PQ, conferia proteção na medida em que se observou uma diminuição significativa da morte celular induzida pelo PQ [55, 56]. Estudos em que se utilizou a metilprednisolona na linha celular A549 culminou em resultados concordantes com os anteriores uma vez que também aqui a citotoxicidade provocada pelo PQ foi significativamente reduzida [57].

## **1.2. Xantonas como potenciais moduladores da P-gp**

As xantonas são compostos heterocíclicos pertencentes à classe das dibenzo- $\gamma$ -pironas, que podem ser encontrados em plantas, fungos e líquen como metabolitos secundários. Estes compostos podem ter uma origem natural ou sintética, e possuem diversas propriedades farmacológicas e atividade biológica, o que tem suscitado elevado interesse científico levando à contínua investigação e fazendo com que sejam muitas vezes denominados como “estruturas privilegiadas” [58-61].

A atividade inibitória das xantonas no crescimento de algumas linhas celulares e a sua capacidade de indução da apoptose em células humanas leucémicas são duas das potenciais aplicações já descritas para estes compostos, porém estas carecem de algumas evidências que permitam o seu suporte. Juntamente com a demonstrada capacidade destes compostos para ligação à P-gp, é imperativa a continuação destes estudos de modo a perceber a ligação entre estes dois mecanismos [59].

Dado o fenómeno MDR causado pela sobre-expressão da P-gp, as xantonas, e à semelhança de outros compostos (bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas da calmodulina, inibidores da Proteína Quinase C (PKC do inglês Protein Kinase C), esteroides, análogos hormonais e flavonoides), fazem parte de um grupo de compostos com elevado potencial no uso como agentes quimioterápicos devido à sua capacidade de modulação da P-gp. Porém, em relação às xantonas, esta informação é ainda escassa recaindo boa parte da investigação sobre a extensão da sua absorção pelas células intestinais de modo a que possam exercer a sua ação nas células neoplásicas assim como sobre a sua capacidade de indução e/ou ativação da P-gp [18, 62].

Em estudos nos quais foram testados derivados xantónicos, e tioxantónicos, em células Caco-2 com o objetivo de avaliar a sua contribuição na indução da atividade e/ou expressão da P-gp, verificou-se o aumento significativo dos dois fenómenos conferindo assim a classificação de indutores da P-gp a estes compostos [63, 64]. Um aspeto de elevada relevância foi o aumento rápido e significativo da atividade da P-gp, o que poderá não estar necessariamente relacionado com o aumento da sua expressão [64]. Nestes estudos usou-se como modelo citotóxico o PQ, tendo-se observado também uma redução da morte celular provocada por este herbicida na presença dos derivados xantónicos [63, 64].

As xantonas apresentam-se como compostos promissores na medida em que poderão ser consideradas como indutores/ativadores da P-gp, observando-se assim um aumento da atividade, num menor período de tempo em comparação com o que acontece com os indutores, uma vez que o mecanismo destes compostos depende da expressão da P-gp e como tal é um processo mais lento. A atuação destes compostos acontece devido à sua ligação a um local específico na P-gp promovendo uma alteração conformacional nesta bomba e, assim, o efluxo

do substrato ligado a outro local específico [18, 65]. Os resultados obtidos sugerem que os derivados xantônicos testados até então apresentam-se como fortes indutores/ativadores da P-gp, conferindo assim proteção contra substratos tóxicos desencadeando a possibilidade de poderem vir a serem usados como antídotos em casos de citotoxicidade induzida por estes substratos [18, 63].



## PARTE II





## 2. Objetivos

A ampla distribuição tecidual da P-gp, assim como a sua importante função de efluxo de diversos substratos, levam esta proteína transportadora a desempenhar um papel de extrema relevância na modulação de processos farmacocinéticos, como a absorção e a distribuição, levando à diminuição da concentração de vários substratos. Isto faz da P-gp uma proteína extremamente importante, uma vez que atua como mecanismo de defesa contra os seus substratos tóxicos, particularmente a nível intestinal onde reduz significativamente a sua absorção neste local e, conseqüentemente, a sua toxicidade limitando o acesso dos seus substratos aos seus órgãos-alvo.

Deste modo, o presente trabalho tem como principais objetivos:

- Avaliar o efeito de novos derivados xantônicos (AX1-AX18) na expressão e atividade da P-gp;
- Avaliar o potencial dos novos derivados xantônicos testados (AX1-AX18) na proteção de células Caco-2 contra a toxicidade mediada pelo PQ, um potente herbicida extremamente tóxico que é substrato da P-gp e que é utilizado em larga escala, a nível mundial, e responsável por uma elevada taxa de intoxicações, quer acidentais quer intencionais.

Na presente dissertação, as células Caco-2 foram utilizadas como modelo *in vitro* da barreira intestinal humana. Estas células são bastante utilizadas como modelo da barreira intestinal humana, permitindo uma boa previsão da biodisponibilidade oral de determinados compostos, fazendo deste um modelo de eleição para rastreio de novos indutores e ativadores da P-gp [5, 53, 66-68]. De facto, este modelo *in vitro* foi anteriormente validado com sucesso para este propósito, permitindo avaliar o potencial de diferentes compostos para interferir com a expressão e atividade desta bomba de efluxo [53].

Adicionalmente, com o objetivo de verificar se o aumento da expressão e/ou atividade da P-gp mediado pelos compostos testados se traduzia num significativa proteção da células contra substratos tóxicos da P-gp, o PQ foi, tal como anteriormente referido, utilizado como modelo de substrato tóxico desta bomba.

Objetivos \_\_\_\_\_

### PARTE III





### 3. Materiais e Métodos

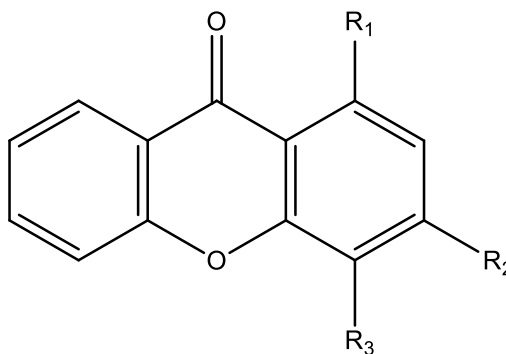
Neste capítulo são apresentados todos as técnicas e procedimentos laboratoriais desenvolvidos no âmbito do trabalho laboratorial efetuado.

#### 3.1. Materiais

Os reagentes rodamina 123 (RHO 123, do inglês *Rhodamine 123*), zosuquidar (ZOS), elacridar e solução de vermelho neutro (NR, do inglês *neutral red*), assim como o meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) com 4,5 g/L glicose, foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os reagentes usados na cultura celular, como aminoácidos não essenciais (NEAA, do inglês *nonessential amino acids*), soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS, do inglês *fetal bovine serum*), 0,25 % tripsina/1 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA do inglês), antibiótico (10000 U/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina), transferrina humana (4 mg/mL), *Hank's balanced salt solution* sem cálcio e magnésio [HBSS (-/-)] e solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline solution*) foram adquiridos aos Laboratórios Gibco (Lenexa, KS, USA). O anticorpo monoclonal da P-gp (clone UIC2) conjugado com ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*) foi obtido da Abcam (Cambridge, United Kingdom). Os reagentes utilizados na Citometria de Fluxo, incluindo a solução de limpeza, solução de descontaminação e *flow cell extended clean solution* foram adquiridos à BD Accuri™. O kit P-gp Glo™ Assay System utilizado na determinação da atividade ATPásica da P-gp foi adquirido à Promega Corporation (Madison, USA). No presente trabalho, todos os reagentes utilizados foram de elevado grau analítico ou do grau mais elevado que se encontrava disponível.

#### 3.2. Síntese de Xantonas

No âmbito do presente trabalho, foram testados 18 derivados xantónicos (**AX1-AX18**) disponibilizados a partir de uma biblioteca de compostos do Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, Departamento de Ciências Químicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. A **Figura 5** ilustra a estrutura base dos derivados xantónicos testados no âmbito do presente trabalho.



**Figura 5.** Estrutura base dos derivados xantônicos testados.

### 3.3. Modelo celular Caco-2

O modelo *in vitro* de células de adenocarcinoma colo-retal humano, as células Caco-2, representa o modelo de eleição usado em estudos, *in vitro*, de avaliação de transporte transepitelial de compostos, de avaliação da permeabilidade e absorção de xenobióticos, de elucidação da vias transportadoras envolvidas, além de permitir estudar o metabolismo pré-sistêmico de fármacos, dado que esta linha celular expressa várias isoenzimas do citocromo P450 (CYP, do inglês *cytochrome P450*) e enzimas da fase II do metabolismo [66, 69-71]. As propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais destas células assemelham-nas aos enterócitos do epitélio do intestino delgado, expressando peptidases e transportadores que podem afetar a estabilidade e transporte dos compostos através das membranas celulares, mimetizando, assim, a absorção no intestino delgado. Este é o motivo pelo qual as células Caco-2 são utilizadas extensivamente na rotina laboratorial como modelo da barreira intestinal uma vez que é possível uma boa previsão da biodisponibilidade oral de determinados compostos, *in vivo*, a partir de ensaios de permeabilidade *in vitro* [66-68, 71, 72]. O facto do trato gastrointestinal constituir a forma mais usual para administração de xenobióticos, seja intencional ou accidental, tornando a absorção um importante alvo de estudo, principalmente quando se testam novos compostos, e sabendo que o intestino (local de elevada expressão da P-gp) atua na defesa contra toxinas e agentes pré-carcinogénicos ingeridos, torna ainda mais relevante a seleção deste modelo celular [71].



A vasta utilização deste modelo pelas indústrias farmacêuticas tem promovido o seu interesse para uma melhor caracterização molecular e funcional de diversos compostos vistos como potenciais substratos de enzimas metabolizadoras e de transportadores, particularmente em ensaios de permeabilidade [68]. Uma vez que muitas intoxicações por substratos tóxicos da P-gp ocorrem por ingestão accidental ou intencional, o papel protetor desta bomba de efluxo é particularmente importante a nível intestinal, onde reduz significativamente a absorção intestinal destes xenobióticos e, conseqüentemente, reduz a sua concentração nos órgãos-alvo [5]. Este papel protetor, aliado ao facto de este modelo *in vitro* já ter sido validado para o *screening* de indutores e ativadores da P-gp [53, 73], justificam a sua seleção no âmbito do presente trabalho.

### 3.3.1. Cultura celular – células Caco-2

As células Caco-2 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). As células foram colocadas em cultura em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (T75) em meio de cultura DMEM com 4,5 g/L glicose, suplementado com 10% de FBS (fornece fatores de crescimento), 100 µM de NEAA (promove o crescimento e viabilidade celular), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (antibióticos usados para impedir a proliferação bacteriana) e 6 µg/mL de transferrina (fornece ferro às células para garantir uma maior qualidade e quantidade celular). A cultura celular era mantida numa estufa nas seguintes condições: atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> – 95% ar e a uma temperatura de 37 °C. Para um bom crescimento celular, o meio de cultura era mudado a cada 3 dias e as culturas sofriam passagens semanalmente através de um processo de tripsinização (0,25 % tripsina/ 1mM EDTA). As sementeiras realizadas nos diferentes estudos eram efetuadas a uma densidade celular de 60000 células/cm<sup>2</sup>, sendo realizadas quando os frascos T75 se apresentassem com cerca de 70-80% de confluência.

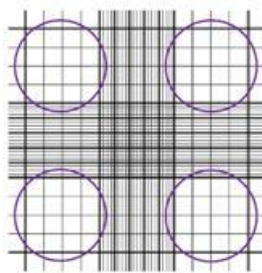
#### 3.3.1.1. Protocolo experimental para a tripsinização das células

Para realizar a tripsinização das células, todos os reagentes foram aquecidos previamente a 37 °C, antes do contacto direto com as células, e a câmara de fluxo

laminar descontaminada com radiação ultravioleta (UV) durante cerca de 15 minutos e limpa com etanol a 70%, assim como todo o material a utilizar antes de ser colocado no seu interior, de modo a assegurar as condições assépticas antes de se iniciar os procedimentos práticos. Os frascos retirados da estufa foram observados ao microscópio ótico de forma a avaliar a sua confluência e a presença de eventuais sinais de contaminação. Já no interior da câmara, o meio de cultura foi rejeitado e os frascos lavados com 10 mL de HBSS (-/-) durante alguns segundos, sendo de seguida rejeitado. Adicionou-se 3 mL de tripsina de forma a cobrir toda a monocamada de células e os frascos foram incubados durante cerca de 5 minutos, a 37 °C, até as células destacarem (monitorizado com o microscópio). Findo o período de incubação, neutralizou-se a tripsina com cerca de 15 mL de meio de cultura e dividiu-se a suspensão obtida por novos frascos. Todos os frascos foram corretamente identificados e colocados novamente na estufa.

#### 3.3.1.2. Protocolo experimental para a sementeira das células

Para realizar a sementeira das células Caco-2, realizou-se todo o procedimento de tripsinização descrito na secção anterior. Obtida a suspensão de células, esta foi transferida para um tubo de 50 mL e devidamente homogeneizada. Realizou-se a contagem das células na câmara de Neubauer e determinou-se qual o volume necessário de DMEM e de suspensão celular para obter a concentração de células desejada ( $n^{\circ}$  de células/mL) para efetuar a respetiva sementeira. Para uma correta contagem das células, deve-se contar as células presentes nos 4 quadrantes (**Figura 6**) e preparar uma suspensão celular que permita semear as células numa densidade de 60000 células por  $\text{cm}^2$ . Por exemplo, nos estudos de citotoxicidade, as células foram semeadas em placas de 96 poços (área do poço:  $0,35 \text{ cm}^2$ ) e para semear 21000 células/poço num volume de 150  $\mu\text{L}$ /poço foi necessário preparar uma suspensão celular com uma densidade de 140000 células/mL.



$$\text{Número células / mL} = \left( \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células nos 4 quadrantes}}{\text{n}^{\circ} \text{ quadrantes}} \right) \times 10\,000$$

**Figura 6.** Esquema da contagem do número de células na câmara de Neubauer e respetiva equação de cálculo da densidade celular.

### 3.3.2. Avaliação da citotoxicidade das xantonas

Antes da avaliação dos efeitos dos compostos alvo do presente estudo na expressão e atividade da P-gp, foi necessário avaliar a sua citotoxicidade de forma a selecionar uma concentração não citotóxica a ser utilizada. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, tal como descrito na secção anterior, e expostas aos compostos 3 dias após a sementeira, tempo necessário para se atingir a sua confluência. Assim, no dia da experiência, o meio de cultura foi removido, as células expostas a AX1 – AX18 (0 - 50  $\mu$ M) em meio de cultura fresco e as placas incubadas durante 24h, a 37°C e numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> – 95% ar. Após este período de incubação, o meio de cultura de cada poço foi aspirado e a viabilidade celular avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro (NR, do inglês *neutral red*).

#### 3.3.2.1. Ensaio de incorporação do NR

O ensaio de incorporação do NR é um método rápido, simples, acessível e amplamente usado para determinar a citotoxicidade de diversos compostos em culturas celulares, apresentando-se com bastante interesse na avaliação da viabilidade celular e dos efeitos de agentes citotóxicos no crescimento celular [74, 75].

A versatilidade deste ensaio permite que seja utilizado na avaliação da citotoxicidade de uma grande variedade de compostos e formulações, tais como

fármacos, champôs, conservantes, agentes antibacterianos, produtos químicos industriais, entre outros. É um método colorimétrico que se baseia na incorporação do NR nos lisossomas de células viáveis, permitindo quantificá-las após um período de incubação com os compostos a testar [76]. A ligação do NR aos lisossomas ocorre porque o corante, fracamente catiónico, penetra nas membranas celulares por difusão passiva não-iônica ligando-se, por ligações eletrostáticas hidrofóbicas e/ou aos grupos fosfato da matriz lisossomal. Posteriormente, o corante incorporado é extraído das células por intermédio de uma solução de etanol acidificado que promove a lise das células e, consequentemente, a libertação do NR. As células lesadas não possuem a capacidade de reter o NR, sendo removido durante o processo de lavagem. Após este passo, a absorvância é quantificada num espectrofotómetro a 540 nm, sendo a viabilidade celular proporcional à concentração de reagente retido pelas células viáveis [75].

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 60000 células/cm<sup>2</sup> (150 µL de uma suspensão de 140000 células/mL > 21000 células/poço) e, uma vez atingida a sua confluência, foram expostas às diferentes xantonas AX1-18 (0-50 µM) durante 24h. Findo o período de exposição, o meio de cultura contendo os compostos foi removido e as células incubadas com NR, preparado em meio de cultura numa concentração de 50 µg/mL, a 37°C num ambiente humedecido com 5% CO<sub>2</sub> - 95% ar durante 60 minutos. Terminada a incubação, remove-se o meio contendo o NR e adiciona-se a solução de lise [álcool etílico absoluto/água destilada (1:1) com 5% de ácido acético glacial) de modo a extrair o corante incorporado pelas células viáveis. Agita-se levemente a microplaca num agitador de placas até cada poço estar devidamente homogeneizado e a absorvância é lida num leitor de placas (PowerWave X BioTek Instruments, Vermont, US) a 540 nm. A citotoxicidade foi avaliada pela percentagem de incorporação do NR relativamente às células controlo (0 µM).

### **3.3.3. Avaliação do efeito das xantonas na expressão da P-gp**

No presente estudo, a avaliação do efeito dos compostos testados na expressão da P-gp foi efetuada por citometria de fluxo, usando um anticorpo monoclonal (UIC2) conjugado com ficoeritrina (PE, do inglês *phycoerythrin*). Para o

efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 12 poços numa densidade celular de 60000 células/cm<sup>2</sup>, as quais, quatro dias após sementeira, quando se atingiu a confluência, foram expostas às xantonas AX1-AX18 numa concentração não citotóxica (20,0 µM) em meio de cultura. Vinte e quatro horas após exposição, o meio de cultura contendo os derivados xantônicos foi removido, as células lavadas com HBSS (-/-) e, posteriormente, destacadas por um processo de tripsinização (0,25% tripsina/1 Mm EDTA). Uma vez obtida a suspensão celular, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 300 g e ressuspensas em HBSS (pH 7,4) contendo 10% de FBS (inativado pelo calor) e o anticorpo monoclonal anti-P-gp (UIC2-PE). A concentração de anticorpo utilizada foi definida de acordo com as instruções do fabricante para citometria de fluxo. Após este passo, procedeu-se à incubação da suspensão celular em banho de água com agitação a 37 °C durante 45 minutos ao abrigo da luz. Após esta incubação, as células foram centrifugadas (300g, 5 minutos, 4°C) e lavadas duas vezes com HBSS (-/-) contendo 10% de FBS. Terminada a última centrifugação, as células foram mantidas em gelo até à respetiva análise por citometria de fluxo. Imediatamente antes de serem submetidas à análise por citometria de fluxo, as células foram ressuspensas em HBSS (-/-) com 10% de FBS (4°C).

A análise por citometria de fluxo efetuada para a avaliação da expressão da P-gp foi realizada com recurso a um citómetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, CA, USA). A fluorescência emitida pelo anticorpo UIC2 conjugado com PE foi avaliada com um filtro de 585 ± 40 nm (detetor FL2), e apresentada sob a forma de um histograma, sendo a análise efetuada com base na aquisição de 20,000 células. O parâmetro utilizado para comparação foi a média de intensidade de fluorescência (MIF, calculada como percentagem de controlo (0 µM). De modo a avaliar a possível contribuição da autofluorescência das células nos sinais de fluorescência obtidos, células não marcadas (sem anticorpo), com ou sem exposição prévia às xantonas testadas, foram também analisadas.

#### **3.3.4. Avaliação do efeito das xantonas na atividade da P-gp**

A atividade transportadora da P-gp foi avaliada usando dois protocolos laboratoriais distintos, ambos com recurso à citometria de fluxo, usando a rodamina

123 (RHO 123, 2  $\mu$ M) como substrato fluorescente da P-gp. O primeiro protocolo consiste num ensaio de avaliação da acumulação da RHO 123 em células Caco-2 que foram previamente expostas às xantonas durante 24h. Neste ensaio, o meio de cultura contendo as xantonas foi removido, as células destacadas por tripsinização e, posteriormente, submetidas a um protocolo de acumulação de RHO 123 com o objetivo de avaliar eventuais alterações na atividade da P-gp decorrentes de eventuais efeitos das xantonas em estudo nos seus níveis de expressão.

O segundo protocolo consiste num ensaio no qual a acumulação do substrato fluorescente da P-gp é efetuada na presença dos derivados xantônicos testados, permitindo, assim, detetar eventuais efeitos imediatos dos compostos na atividade da proteína. Assim, este protocolo de incubação das células Caco-2 com as xantonas apenas durante a fase de acumulação da RHO 123 permitirá avaliar a potencial ativação da P-gp, ou seja, o eventual aumento da atividade da proteína sem alteração dos seus níveis de expressão.

#### **3.3.4.1. Ensaio de acumulação da RHO 123 na presença das xantonas testadas**

As células Caco-2 foram semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> e, após atingirem a confluência, foram lavadas com HBSS (-/-) e, posteriormente, recolhidas por um processo de tripsinização (0,25% tripsina/1 mM EDTA) obtendo-se uma suspensão celular. Esta suspensão celular foi, então, dividida em diversas alíquotas de 300000 células/mL. As células foram centrifugadas (300g durante 5 minutos, a 4°C) e submetidas aos seguintes procedimentos:

- **Acumulação da rodamina em condições normais (AN):** as células foram ressuspensas em HBSS com 10% de FBS, contendo RHO 123 (2  $\mu$ M), na presença e na ausência dos derivados xantônicos testados (20,0  $\mu$ M), mas na ausência do inibidor da P-gp (elacridar). Após a sua ressuspensão, as células foram incubadas durante 60 minutos, a 37 °C, em banho de água com ligeira agitação e ao abrigo da luz. Em cada ensaio, cada uma das condições de exposição testada foi realizada em triplicado.

■ **Acumulação da rodamina em condições de inibição da P-gp (AI):** as células foram ressuspensas em HBSS com 10% de FBS, contendo RHO 123 (2 µM) e o inibidor da P-gp (elacridar 10,0 µM), na presença e na ausência dos derivados xantônicos testados (20,0 µM). Após ressuspensão, as células foram incubadas durante 60 minutos, a 37 °C, em banho de água com ligeira agitação e ao abrigo da luz. Em cada ensaio, cada uma das condições de exposição foi realizada em triplicado.

No final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS com 10% de FBS, centrifugadas (300g durante 5 minutos, a 4°C) e mantidas no gelo até à análise por citometria de fluxo.

As determinações por citometria de fluxo foram realizadas de acordo com o descrito para a avaliação da expressão da P-gp, ou seja, com base na aquisição de 20000 células. A fluorescência intracelular da RHO123 foi medida por um filtro de  $530 \pm 15$  nm (FL1) e expressa como média de intensidade de fluorescência (MIF). Os resultados foram calculados de acordo com a equação abaixo representada (**Equação 1**) e expressos como percentagem do controlo (AX 0 µM).

$$\text{Acumulação da RHO 123} = \frac{\text{MIF acumulação de RHO 123 sob condições de inibição (AI)}}{\text{MIF acumulação normal de RHO 123 (AN)}}$$

**Equação 1.** Atividade da P-gp avaliada pela razão entre a quantidade de RHO 123 acumulada em condições de inibição da P-gp e a quantidade de RHO 123 acumulada na ausência de inibidor.

À medida que a atividade da P-gp aumenta, aumenta também o efluxo da RHO 123 mediado por esta bomba, o qual é acompanhado por um decréscimo na intensidade de fluorescência intracelular uma vez que a quantidade de RHO 123 no interior das células está a diminuir como consequência do seu efluxo para o exterior das células. Assim, uma maior razão  $MFI_{AI}/MFI_{AN}$  resulta de um menor valor de  $MFI_{AN}$ , o qual é uma consequência de uma maior atividade da P-gp, uma vez

que a RHO 123 está a ser bombeada para fora das células durante a fase de acumulação efetuada na ausência de inibidor da P-gp.

#### **3.3.4.2. Ensaio de acumulação da RHO 123 em células Caco-2 pré-expostas às xantonas durante 24 h**

Para o ensaio de avaliação da atividade da P-gp 24 h após exposição aos derivados xantónicos, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 12 poços numa densidade celular de 60000 células/cm<sup>2</sup> de modo a obter a respetiva confluência no dia da exposição. Obtida a confluência, as células foram expostas às xantonas AX1-AX18 (20,0 µM) em meio de cultura durante um período de 24h. Finda a incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (-/-) e submetidas a um processo de tripsinização (0,25% tripsina/1mM EDTA) para obter uma suspensão celular. Posteriormente, as células de cada poço foram divididas em duas alíquotas: a primeira alíquota foi submetida a uma fase de acumulação da RHO 123 sob condições de inibição da P-gp – [acumulação de RHO 123 na presença de um inibidor da P-gp, o elacridar (**AI**)]; e a segunda alíquota foi submetida a uma fase de acumulação da RHO 123 em condições normais [acumulação de RHO 123 na ausência de inibidor da P-gp (**AN**)]. Para a AI as células foram centrifugadas (300g, 5 min, a 4 °C), ressuspensas em HBSS com 10% de FBS, RHO 123 (2 µM) e elacridar (10 µM) e incubadas durante 60 minutos a 37 °C em banho de água com ligeira agitação e ao abrigo da luz, permitindo a máxima acumulação do substrato fluorescente da P-gp uma vez que esta se encontrava inibida. Para a AN foi efetuada uma incubação semelhante mas na ausência de elacridar. No final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS com 10% de FBS e ressuspensas no mesmo tampão imediatamente antes da análise. A análise por citometria de fluxo foi efetuada de acordo com o anteriormente descrito, sendo a fluorescência verde da RHO 123 medida usando um filtro de 530 ± 15 nm (FL1). Os resultados foram calculados de acordo com a **Equação 1** e expressos como percentagem de controlo (AX 0 µM).

#### **3.3.5. Avaliação do efeito das xantonas na atividade ATPásica da P-gp**

A avaliação da atividade ATPásica da P-gp, na presença e na ausência dos derivados xantónicos, foi realizada utilizando o ensaio *Pgp-Glo*<sup>™</sup> Assay (Promega),



de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. Este ensaio de luminescência utiliza membranas enriquecidas em P-gp recombinante humana e baseia-se na avaliação da quantidade de ATP não consumida na mistura reaccional. Ou seja, as membranas são inicialmente incubadas com ATP, na presença e ausência dos compostos teste, a reação é posteriormente parada e o ATP remanescente não consumido é detetado como consequência do sinal de luminescência gerado pela enzima luciferase. Uma diminuição na luminescência dependente da P-gp indica o consumo do ATP pela bomba, o que significa que quanto maior for a diminuição do sinal, maior será a atividade da P-gp uma vez que uma maior quantidade de ATP foi consumido por esta bomba de efluxo. Desta forma, amostras que contenham compostos que estimulem a atividade ATPásica da P-gp apresentarão sinais significativamente menores do que amostras não tratadas.

A atividade da ATPásica da P-gp é analisada através da comparação de amostras não tratadas (**NT**) com amostras tratadas com os compostos teste (**CT**) e amostras tratadas com ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), composto usado como controlo positivo de inibição da P-gp. O  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  é um inibidor seletivo da P-gp e, por esse motivo, quando presente nas misturas reacionais, leva a que se verifique a ausência de atividade ATPásica da P-gp. Quando ausente, a atividade ATPásica basal da P-gp ou a estimulada por compostos alvo do estudo pode ser detetada. Na presença de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , o consumo de ATP observado deve-se à atividade de outras ATPases que não a P-gp, presentes nas membranas. Assim, este ensaio permite analisar o efeito dos compostos em estudo na atividade ATPásica da P-gp possibilitando a sua caracterização como inibidores ou estimulantes da atividade ATPásica da P-gp. Um dos compostos que estimulam a atividade ATPásica da P-gp é o Verapamilo, utilizado neste ensaio como controlo positivo de estimulação da atividade ATPásica. Por outro lado, quando se observa uma diminuição na atividade ATPásica da P-gp por um dado composto, significa que este é um inibidor da sua atividade ATPásica.

O método utilizado é composto por duas etapas: a primeira etapa em que as membranas são incubadas com ATP, o qual vai ser consumido pela P-gp no processo de transporte e a segunda etapa na qual ocorre a reação de deteção do ATP remanescente não consumido. Na primeira fase, as membranas enriquecidas com P-gp recombinante humana (25  $\mu\text{g}$ /reação) são incubadas com os derivados

xantônicos AX1-18 (20  $\mu$ M), ou  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (100  $\mu$ M) ou Verapamilo (200  $\mu$ M) em tampão de ensaio e ATP numa concentração não limitante (5mM) durante 60 minutos a 37°C. São igualmente efetuadas misturas reacionais na ausência dos compostos acima referidos (**NT**). Após esta incubação, as reações são interrompidas e o ATP remanescente detetado, após um período de desenvolvimento de sinal de 20 minutos à temperatura ambiente, como um sinal de luminescência gerado pela luciferase, o qual foi quantificado num leitor de placas BioTek Synergy™.

A diminuição da luminescência das incubações **NT** (ausência de compostos) em relação às incubações efetuadas na presença de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  reflete a atividade ATPásica **basal** da P-gp. A diminuição da luminescência das incubações efetuadas com o controlo positivo Verapamilo em relação às misturas reacionais efetuadas na presença de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  reflete a atividade ATPásica da P-gp estimulada pelo Verapamilo. A alteração na luminescência das reações efetuadas na presença das AX1-18 em relação às misturas reacionais efetuadas na presença de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  reflete o efeito, se houver, dos compostos em estudo na atividade ATPásica da P-gp (isto é, uma diminuição da luminescência reflete uma estimulação da atividade ATPásica da P-gp). Assim, para a análise dos resultados obtidos, as seguintes equações foram utilizadas para calcular a variação nos sinais da luminescência ( **$\Delta$ RLU**, *relative light units*):

1.  **$\Delta$ RLU<sub>basal</sub>** =  $\text{RLU}_{\text{Na}_3\text{VO}_4} - \text{RLU}_{\text{NT}}$ , que reflete a atividade **ATPásica basal** da P-gp
2.  **$\Delta$ RLU<sub>CT</sub>** =  $\text{RLU}_{\text{Na}_3\text{VO}_4} - \text{RLU}_{\text{CT}}$ , que reflete a atividade **ATPásica** da P-gp na presença de um determinado composto teste (CT).

### 3.3.6. Avaliação do efeito das xantonas na citotoxicidade do Paraquato

A avaliação da citotoxicidade do PQ realizou-se com recurso ao ensaio de incorporação do NR com e sem incubação simultânea do herbicida e das xantonas alvo do presente estudo. O objetivo do presente ensaio era verificar se as alterações observadas na expressão e atividade da P-gp, ocorridas após exposição aos compostos testados, se traduzia numa proteção eficaz contra a toxicidade de

um substrato tóxico da P-gp, o PQ. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços (a uma densidade de 60000 células/cm<sup>2</sup>) e, quando atingida a confluência, expostas ao PQ (0 – 5000 µM), na presença e ausência de xantonas numa concentração não citotóxica de 20 µM. Vinte e quatro horas após a exposição a citotoxicidade do PQ foi avaliada pelo ensaio de incorporação do NR, de acordo com o descrito na secção 3.3.2.1.

De modo a verificar o envolvimento da P-gp no potencial efeito protetor mediado pelas xantonas em estudo, este procedimento teve de ser repetido na presença de um inibidor da P-gp., tendo sido o ZOS (LY 335979) o inibidor usado no presente estudo. No entanto, foi necessário selecionar primeiro uma concentração não citotóxica de ZOS a ser usada nos estudos seguintes. Para o efeito, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços e expostas, após atingida a confluência, a ZOS 1 e 10 µM durante 24 h. A citotoxicidade deste inibidor de terceira geração foi posteriormente avaliada pelo ensaio de incorporação do NR, tal como descrito na secção 3.3.2.1.

Para avaliar a citotoxicidade mediada pelo PQ na presença ou ausência do inibidor, as células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços e, após atingirem a confluência, foram expostas ao PQ (0 – 5,000 µM) na presença e ausência de ZOS nas concentrações não citotóxicas de 1 e 10 µM. Vinte e quatro horas após a exposição ao herbicida, realizou-se o ensaio de incorporação do NR, tal como descrito na secção 3.3.2.1. Realizou-se igualmente uma condição diferente de incubação com ZOS na concentração de 10 µM, com o objetivo de verificar se o efeito deste inibidor na citotoxicidade do PQ estaria eventualmente relacionado com a reatividade do ZOS com o PQ, limitando a sua captação intracelular. Para tal, as células Caco-2 foram pré-incubadas com ZOS 10 µM durante 1h. Posteriormente, o inibidor foi removido e as células expostas a PQ (0 – 5000 µM) em meio de cultura durante 24 h. No final deste período de exposição, a citotoxicidade do PQ foi avaliada pelo ensaio de incorporação do NR.

### **3.3.7. Análise estatística**

Toda a análise estatística foi efetuada com recurso ao programa GraphPad Prism 6 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Realizaram-se

três testes para avaliar a distribuição dos dados obtidos: *KS normality test*, *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* e *Shapiro-Wilk normality test*. Para os dados com distribuição paramétrica, as comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao teste de *One-way ANOVA*, seguido pelo *Holm-Sidak's multiple comparisons test*. Para os dados com distribuição não paramétrica, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *Dunn's multiple comparisons test*. Nos ensaios com duas variáveis (ensaios de avaliação da citotoxicidade do PQ), utilizou-se o teste de *Two-way ANOVA* seguido do *Sidak's multiple comparisons post hoc test*. Nos ensaios de citotoxicidade do PQ, as curvas de concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados e as comparações entre as curvas PQ e PQ + AXs [LOG EC<sub>50</sub>, Hill Slope, máximo (TOP) e mínimo (BOTTOM) de morte celular] foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Cada figura tem na respetiva legenda toda a análise estatística realizada. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## PARTE IV





#### 4. Resultados e Discussão

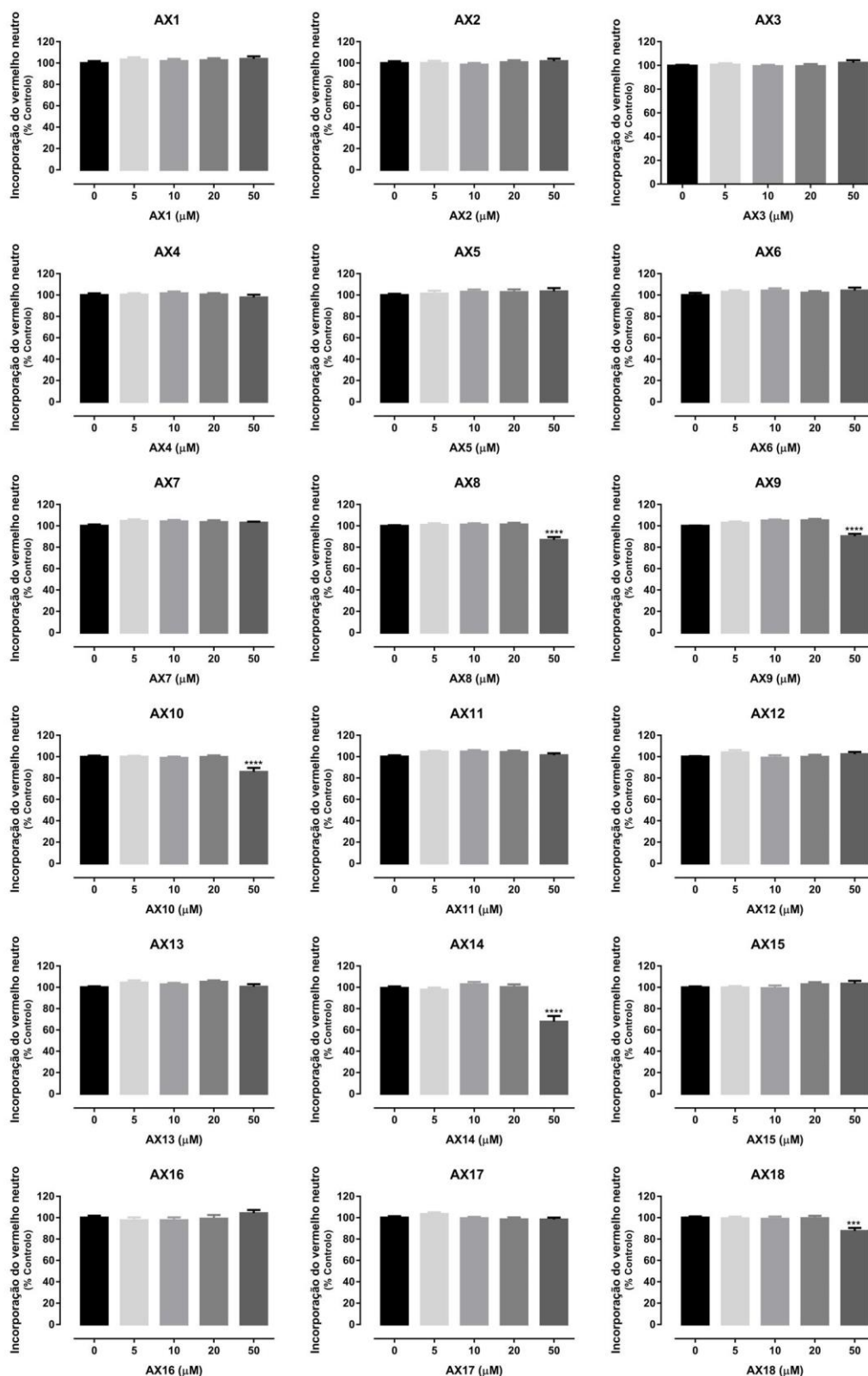
Os 18 derivados xantônicos testados no âmbito do presente estudo foram divididos em 2 grupos, de acordo com a sua complexidade química, de modo a simplificar a execução dos ensaios laboratoriais. Os compostos foram, então, divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo A:** AX1, AX2, AX5, AX6, AX12, AX16
- **Grupo B:** AX3, AX4, AX7, AX8, AX9, AX10, AX11, AX13, AX15, AX17, AX18

##### 4.1. Citotoxicidade das Xantonas – Ensaio de incorporação do vermelho neutro

A citotoxicidade das xantonas (0 – 50  $\mu$ M) foi avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24h após a exposição das células Caco-2 aos derivados xantônicos em estudo, de modo a ser possível selecionar uma concentração não citotóxica a ser utilizada nos estudos subsequentes. Assim, após a análise dos gráficos apresentados (**Figura 7**), é possível verificar que, das 18 xantonas testadas, apenas cinco - AX8, AX9, AX10, AX14 e AX18 - provocaram uma diminuição significativa da viabilidade celular na concentração mais elevada (50  $\mu$ M), 24 h após exposição. As restantes xantonas – AX1, AX2, AX3, AX4, AX5, AX6, AX7, AX11, AX12, AX13, AX15, AX16 e AX17 – não revelaram qualquer efeito citotóxico significativo em nenhuma das concentrações testadas após 24h de incubação.

Deste modo, com base nos resultados obtidos, foi selecionada a concentração de 20  $\mu$ M para a continuidade dos ensaios visto ser esta uma concentração não citotóxica nas presentes condições experimentais, e para todos os derivados xantônicos testados. Esta concentração demonstrou, em estudos anteriores, a capacidade de derivados xantônicos e tioxantônicos para aumentar significativamente a expressão e atividade da P-gp em células Caco-2, 24 h após exposição [63, 64].

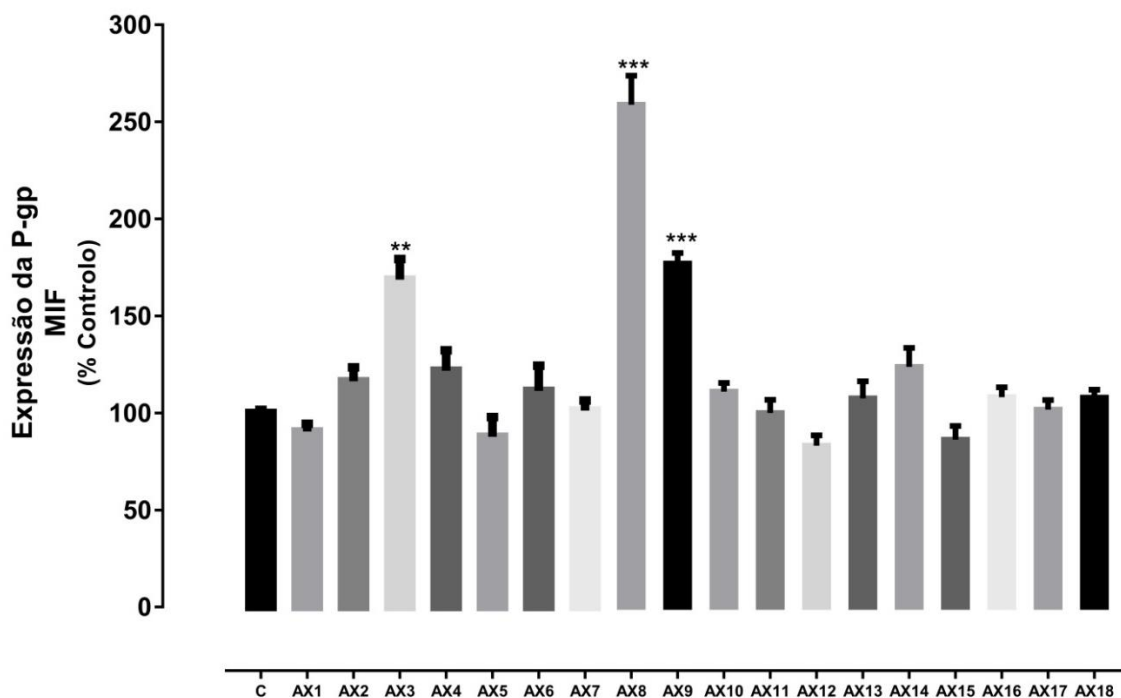


**Figura 7.** Citotoxicidade das xantonas **AX1 - AX18** (0 - 50 µM) em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24 horas após a exposição. Os resultados são apresentados como Média ± SEM de, pelo menos, 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método paramétrico de *One-way* ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Holm-Sidak* [\*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. controlo (0 µM)].



#### 4.2. Avaliação do efeito das xantonas na expressão da P-gp

A expressão da P-gp foi avaliada, por citometria de fluxo, em células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (20,0  $\mu$ M), usando o anticorpo monoclonal UIC2 conjugado com PE. De acordo com a **Figura 8**, é possível verificar que, de todas as xantonas testadas, quer do grupo A quer do grupo B, as **AX3**, **AX8** e **AX9** induziram um aumento significativo nos níveis de expressão da P-gp após 24 h de exposição [a expressão da P-gp aumentou para 169, 259 e 177 % em relação ao controlo (0  $\mu$ M), após exposição a **AX3**, **AX8** e **AX9**, respetivamente]. Destas 3 xantonas, a **AX8** demonstrou ser o composto com maior potencial indutor. As restantes xantonas testadas não induziram diferenças significativas nos níveis de expressão da P-gp comparativamente com os níveis detetados nas células controlo (0  $\mu$ M).

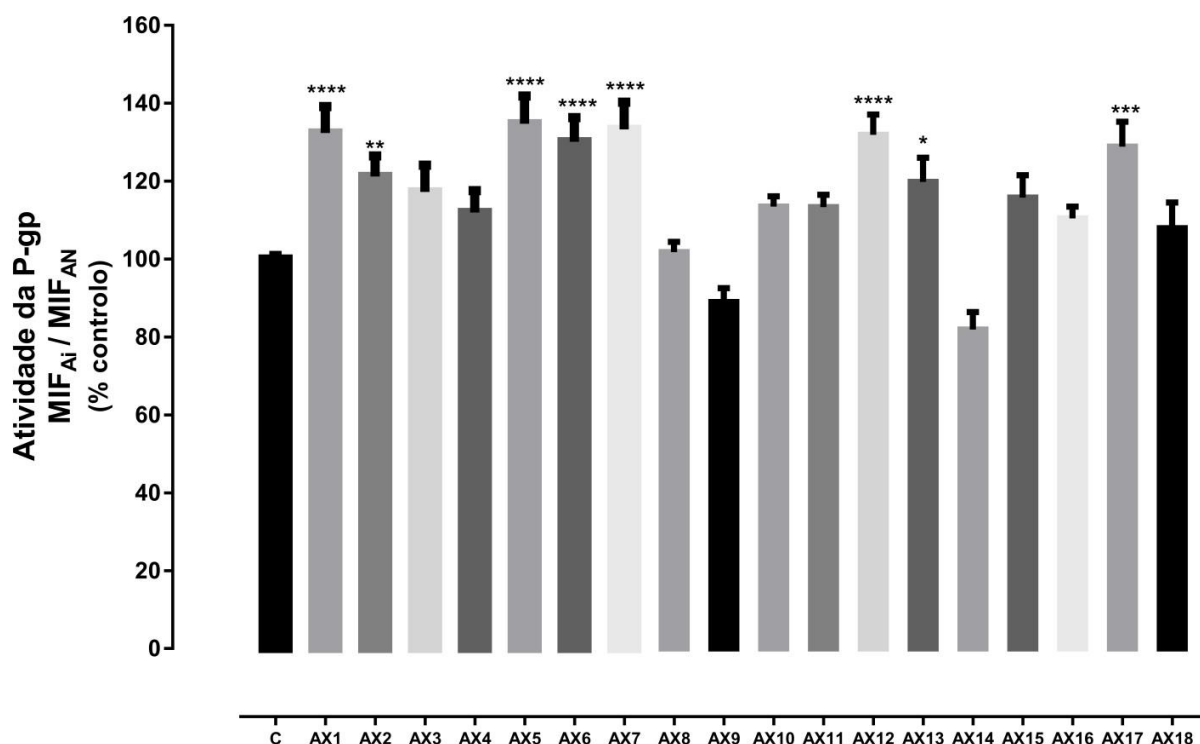


**Figura 8.** Níveis de expressão da P-gp em células Caco-2, 24 h após exposição aos derivados xantônicos (**AXs 1-18**, 20  $\mu$ M). Os resultados são apresentados como Média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes (realizadas em duplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo *Dunn's multiple comparisons test* [**\*\***  $p < 0,01$ ; **\*\*\***  $p < 0,001$  vs. controlo (**C**, 0  $\mu$ M)].

### 4.3. Avaliação do efeito das xantonas na atividade da P-gp

A atividade da P-gp foi avaliada usando dois protocolos experimentais diferentes: o primeiro através da avaliação da acumulação de RHO 123 na presença dos derivados xantônicos (20  $\mu$ M) em estudo (**Figura 9**) durante os 60 minutos de acumulação do substrato fluorescente da P-gp; e o segundo através da avaliação da acumulação de RHO 123 após uma pré-exposição das células Caco-2 às xantonas (20  $\mu$ M) durante 24 h (**Figura 10**). O primeiro ensaio permite avaliar o potencial efeito imediato dos derivados xantônicos testados na atividade da P-gp como resultado de uma ativação direta da bomba. O segundo ensaio permite avaliar se o potencial aumento da expressão da P-gp se traduz num aumento da sua atividade.

Observando a **Figura 9**, é perceptível que as xantonas **AX1**, **AX2**, **AX5**, **AX6**, **AX7**, **AX12**, **AX13** e **AX17** aumentaram significativamente, e de uma forma imediata (dado o curto período de incubação), a atividade da P-gp nas células expostas em comparação com as células controlo (AXs 0  $\mu$ M), podendo assim ser classificadas como ativadores da P-gp (a atividade da P-gp aumentou para 132, 121, 135, 130, 133, 132, 120 e 129% quando a acumulação da RHO 123 era efetuada na presença dos derivados xantônicos **AX1**, **AX2**, **AX5**, **AX6**, **AX7**, **AX12**, **AX13** e **AX17**, respetivamente).



**Figura 9.** Atividade da P-gp em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de acumulação da RHO 123 na presença dos derivados xantônicos (**AXs 1-18**, 20  $\mu$ M) durante a fase de acumulação do substrato fluorescente da P-gp. Os resultados são apresentados como Média  $\pm$  SEM de 6 e 4 experiências independentes (realizadas em triplicado), para as AXs dos grupo A e B, respetivamente. As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo *Dunn's multiple comparisons test* [\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. controlo (**C**, 0  $\mu$ M)].

Considerando o segundo protocolo experimental (**Figura 10**), é possível verificar que as xantonas **AX1**, **AX5**, **AX6** e **AX12** aumentaram significativamente a atividade da P-gp relativamente às células controlo (AXs 0  $\mu$ M), (a atividade da P-gp aumentou para 128, 133, 121 e 126 % em células Caco-2 pré-expostas durante 24 h às **AX1**, **AX5**, **AX6** e **AX12**, respetivamente).

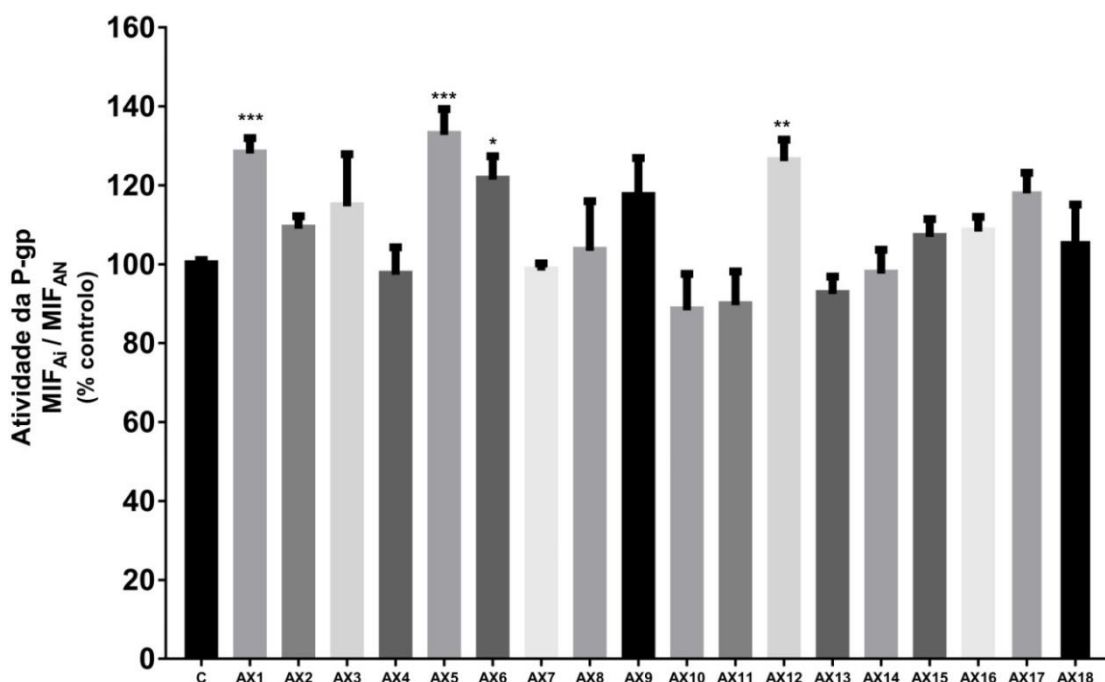
Contudo, o aumento da atividade da P-gp observado após uma pré-exposição de 24 h (**Figura 10**) às **AX1**, **AX5**, **AX6** e **AX12** não resulta de um aumento da expressão desta bomba de efluxo, uma vez que não foi observado qualquer aumento significativo na expressão da P-gp 24h após exposição a estes derivados xantônicos (**Figura 8**). Por outro lado, e de acordo com a **Figura 9**, estes derivados xantônicos apresentaram a capacidade de aumentar a atividade da P-gp como uma consequência de uma ativação direta da bomba (**Figura 9**). Desta forma,

o aumento de atividade observado em células Caco-2 pré-expostas a estes compostos pode ser o resultado de uma ativação direta da bomba provocada pelo composto que possa ter permanecido a nível intracelular após o período de exposição e posterior lavagem das células. A ativação direta é, assim, uma possível explicação para os resultados obtidos dado que se demonstrou, no primeiro ensaio, que estas xantonas são ativadoras da P-gp (**Figura 9**).

Por outro lado, não se observou qualquer aumento significativo na atividade da P-gp em células Caco-2 pré-expostas aos compostos **AX3**, **AX8** e **AX9**, os quais aumentaram significativamente a expressão desta proteína. Assim, os resultados demonstram que, apesar da P-gp sintetizada *de novo* estar já incorporada na membrana plasmática (uma vez que o UIC2 reconhece um epítipo externo da proteína), ela poderá não estar ainda completamente funcional. No entanto, de salientar que para os derivados xantônicos do grupo B, que incluem os compostos **AX3**, **AX8** e **AX9**, apenas foram efetuadas duas experiências independentes de avaliação da acumulação da RHO 123 24h após exposição, e que, por esse motivo, a tendência observada para uma aumentada atividade da P-gp 24 h após exposição a **AX3** e **AX9** não é ainda estatisticamente significativa. Estes resultados demonstram a importância da determinação simultânea da expressão e da atividade da P-gp uma vez que um aumento no primeiro parâmetro nem sempre se traduz num aumento do segundo, à semelhança do que foi já previamente demonstrado em diversos estudos [55, 56, 77]. Por exemplo, a exposição de células Caco-2 a doxorrubicina (0 - 100  $\mu$ M) resultou num aumento significativo na expressão e atividade da P-gp de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição testado, apesar dos aumentos observados nos níveis de expressão não serem proporcionais aos aumentos observados na atividade da proteína [56]. Por exemplo, após 6h de exposição a doxorrubicina 50  $\mu$ M, os níveis de expressão da P-gp aumentaram para 300%, apesar da atividade da proteína aumentar apenas para 120 % [56]. Resultados semelhantes foram observados em linfócitos humanos nos quais se observou que o aumento significativo da expressão da P-gp observado em função da idade dos indivíduos não foi acompanhado por um aumento na atividade do transportador [55].

Os ensaios de avaliação da expressão revelaram que as xantonas **AX3**, **AX8** e **AX9** induziram um aumento significativo nos níveis de expressão, enquanto que

nos ensaios de avaliação da atividade, as xantonas **AX1**, **AX2**, **AX5**, **AX6**, **AX7**, **AX12**, **AX13** e **AX17** (no ensaio na presença dos derivados xantônicos) e **AX1**, **AX5**, **AX6** e **AX12** (no ensaio após pré-exposição de 24h) podem ser consideradas como ativadoras da P-gp. Estas xantonas aumentaram a atividade da proteína sem aumentar a expressão.

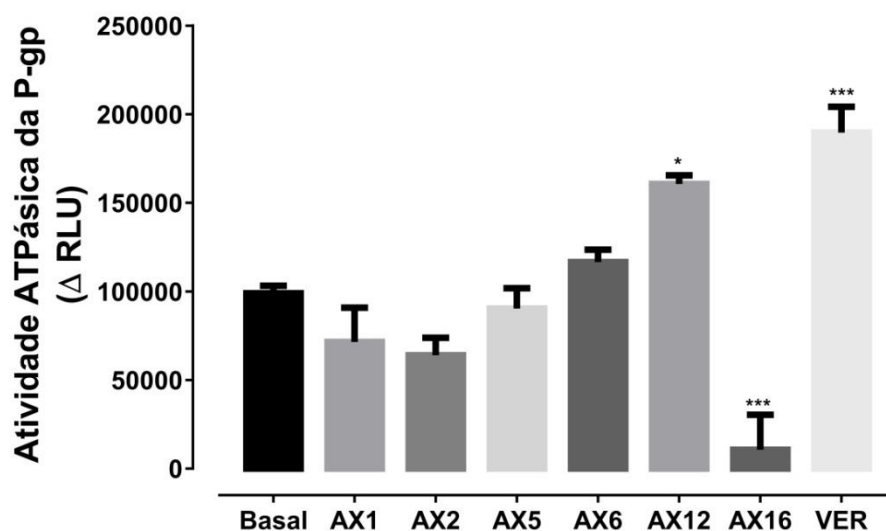


**Figura 10.** Atividade da P-gp em células Caco-2, avaliada pelo ensaio de acumulação da RHO 123, 24 h após exposição ao derivados xantônicos (**AXs 1-18**, 20 µM). Os resultados são apresentados como Média ± SEM de 4 e 2 experiências independentes (realizadas em duplicado), para as AXs dos grupos A e B, respetivamente. As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo *Dunn's multiple comparisons test* [\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 vs. controlo (**C**, 0 µM)].

#### 4.4. Avaliação do efeito das xantonas na atividade ATPásica da P-gp

A avaliação do efeito dos derivados xantônicos testados na atividade ATPásica da P-gp foi apenas realizada para as xantonas do grupo A. De acordo com a **Figura 11**, as xantonas **AX12** e **AX16** provocam um efeito significativo na atividade ATPásica da P-gp, em vesículas membranares contendo P-gp recombinante humana. A **AX12** aumentou significativamente a atividade ATPásica da P-gp em comparação com a atividade ATPásica basal, o que indicia que esta

xantona é substrato da P-gp, apesar de não apresentar um efeito tão acentuado como o Verapamilo, composto utilizado como controlo positivo de estimulação da atividade ATPásica da P-gp. No que diz respeito à **AX16**, esta xantona diminuiu significativamente a atividade ATPásica da P-gp relativamente à atividade ATPásica basal. Este resultado demonstra que este derivado xantónico inibe a atividade ATPásica da P-gp, apesar de não se ter observado qualquer efeito inibitório quando a atividade da P-gp foi avaliada pelos ensaios de acumulação da RHO 123. Contudo, de salientar que a diferença detetada entre os dois ensaios no que respeita à **AX16** pode estar relacionada com a permeabilidade do composto, uma vez que o ensaio de avaliação da atividade ATPásica usa frações membranares e, portanto, não é influenciado pela permeabilidade dos compostos, em contraste com o ensaio de acumulação da RHO 123 efetuado em células Caco-2 [57].

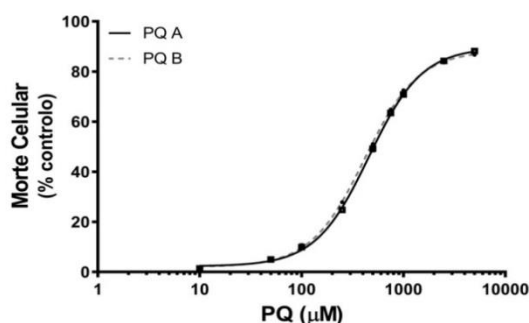


**Figura 11.** Atividade ATPásica da P-gp avaliada na presença dos derivados xantónicos (**AXs grupo A**, 20  $\mu$ M). O Verapamilo (VER) foi usado nesta experiência como controlo positivo de estimulação da atividade ATPásica da P-gp. Os resultados são apresentados como Média  $\pm$  SEM de 2 experiências independentes (realizadas em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método de *One-way ANOVA*, seguido pelo *Holm-Sidak's multiple comparisons test* [\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. basal].

#### 4.5. Efeitos protetores das Xantonas contra a toxicidade induzida pelo Paraquato

No presente estudo, o objetivo era avaliar o potencial efeito protetor mediado pelas xantonas **AX1-AX18** na citotoxicidade provocada pelo PQ, substrato tóxico da P-gp, de modo a correlacionar esse efeito com a sua capacidade para aumentarem a expressão e/ou atividade desta bomba de efluxo. Para tal, a citotoxicidade do PQ (0 – 5000  $\mu\text{M}$ ) foi avaliada, pelo ensaio de incorporação do NR, com ou sem exposição simultânea às xantonas em estudo (20  $\mu\text{M}$ ), durante 24h.

Dada a complexidade do estudo, os ensaios efetuados para a avaliação do potencial efeito protetor dos derivados xantônicos dos grupos A e B na citotoxicidade do PQ ocorreram em períodos temporais diferentes. No entanto, foi possível verificar uma elevada semelhança entre as duas curvas de concentração-resposta (morte celular) do PQ (ou seja, as curvas obtidas na ausência de derivados xantônicos) nos ensaios realizados para os dois grupos de compostos (**Figura 12**). Assim, dada a semelhança entre as curvas PQ obtidas nos ensaios com xantonas do grupo A e do grupo B, é possível a comparação dos resultados obtidos para derivados xantônicos testados em grupos de experiências diferentes.



**Figura 12.** Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas para as experiências com os compostos do grupo A e do grupo B. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de 5 e 4 experiências independentes realizadas no grupo A e B, respetivamente. As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ A e B (LOG EC50, *Hill Slope*, máximo e mínimo de morte celular) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando *Two-way ANOVA*, seguido do *Sidak's multiple comparisons post hoc test*. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

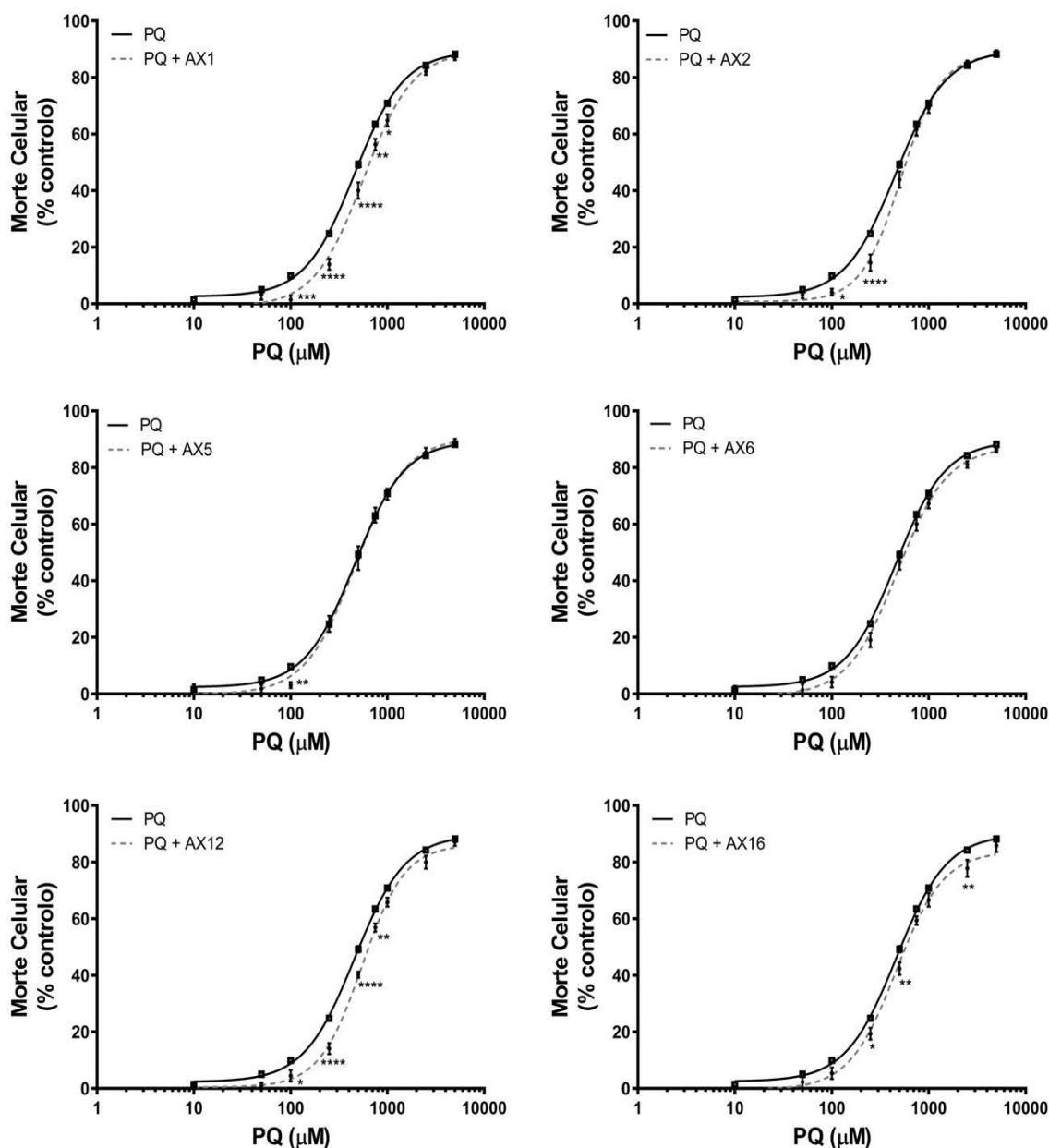
A **Figura 13** e a **Figura 14** ilustram a citotoxicidade do PQ (0 – 5000  $\mu$ M), na presença e na ausência das xantonas (**AXs**) em estudo (20  $\mu$ M), 24 h após exposição. Nestas figuras é possível observar sempre, em cada gráfico, a presença de 2 curvas: uma que resulta da incubação apenas com **PQ** e outra obtida após incubação simultânea de PQ com cada uma das xantonas testadas (**PQ + AXs**) durante 24 h.

Na **Figura 13**, é possível observar uma redução significativa da morte celular nas concentrações de PQ entre 100 e 1000  $\mu$ M quando as células Caco-2 eram expostas simultaneamente ao herbicida e às xantonas **AX1**, **AX2** ou **AX12**, em comparação com a curva resultante da exposição apenas a PQ. Adicionalmente, as curvas obtidas na presença destes derivados xantônicos não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de máximo (TOP) e de mínimo (BOTTOM) de morte celular, quando comparados com a curva do **PQ** (**Tabela 4**). Deste modo, o valor de  $EC_{50}$ , que representa a concentração de PQ capaz de provocar metade do efeito máximo, pode ser usado como medida comparativa entre as curvas obtidas. Assim, a exposição simultânea das células Caco-2 ao PQ e às xantonas **AX1**, **AX2** ou **AX12** resultou num desvio significativo das curvas **PQ + AXs** para a direita (redução significativa da citotoxicidade do PQ), acompanhado de um aumento significativo do valor de  $EC_{50}$  [560,3; 519,8 e 546,6  $\mu$ M, para as curvas concentração-resposta do PQ obtidas após exposição simultânea a **AX1**, **AX2** ou **AX12**, respetivamente, quando comparando com o o valor de  $EC_{50}$  obtido após exposição ao PQ isoladamente (457,8  $\mu$ M)] (**Tabela 4**) Em relação à **AX6**, apesar da diferença significativa observada entre a curva obtida com PQ e a curva resultante da exposição simultânea a PQ e AX6 (**PQ + AX6**) não foi encontrada qualquer diferença significativa entre os valores de  $EC_{50}$ , TOP, BOTTOM e Hill Slope das curvas referidas (**Tabela 4**). Relativamente à **AX5**, não existe diferença significativa entre a curva do PQ e a curva obtida após exposição simultânea ao herbicida e à AX5 (**PQ + AX5**), o que demonstra que esta xantona não exerce qualquer efeito protetor contra a citotoxicidade mediada pelo PQ. No caso da curva concentração-resposta resultante da exposição simultânea a PQ e à **AX16**, o valor de  $EC_{50}$  não foi utilizado para comparação dada a existência de uma diferença significativa entre os valores de máximo de morte celular (TOP) entre as curvas **PQ** e **PQ + AX16** (**Tabela 4**), sendo este o parâmetro usado para comparação. Deste



modo, a exposição simultânea ao herbicida e à **AX16** resultou num desvio significativo da curva **PQ + AX16** para a direita (**Figura 13**), demonstrando a diminuição significativa da citotoxicidade do PQ, acompanhado de uma diminuição significativa do máximo de morte celular (TOP de 85,10 % obtido para a curva PQ + AX16, em comparação com o valor de TOP de 89,63 % obtido para a curva PQ).

Desta análise pode concluir-se que as xantonas do grupo A com maior efeito protetor são as **AX1**, **AX2** e **AX12**, causando uma diminuição significativa na citotoxicidade induzida pelo PQ (**Tabela 4**, **Figura 13**). De salientar que estes derivados xantônicos foram capazes de aumentar significativamente a atividade da P-gp, num processo resultante de uma ativação direta desta bomba de efluxo (**Figura 9**). Contudo, a **AX5** e **AX6**, que aumentaram significativamente a atividade da proteína (**Figura 9** e **Figura 10**), não foram capazes de proteger contra a citotoxicidade do herbicida.



**Figura 13.** Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + AXs) das AXs testadas (20  $\mu$ M). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de 5 experiências independentes (realizadas em triplicado). As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + AXs (LOG EC<sub>50</sub>, *Hill Slope*, máximo e mínimo de morte celular) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando *Two-way ANOVA*, seguido do *Sidak's multiple comparisons post hoc test* (\* $p$  < 0,05; \*\* $p$  < 0,01; \*\*\* $p$  < 0,001; \*\*\*\* $p$  < 0,0001 PQ + AXs vs. PQ). Em todos os casos, valores de  $p$  < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

**Tabela 4** - Valores de EC<sub>50</sub> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo – morte celular), TOP (efeito máximo), BOTTOM (efeito mínimo) e Hill slope das curvas concentração-resposta ao PQ obtidas com (PQ + AXs) ou sem (PQ) exposição simultânea aos derivados xantônicos (20 µM).

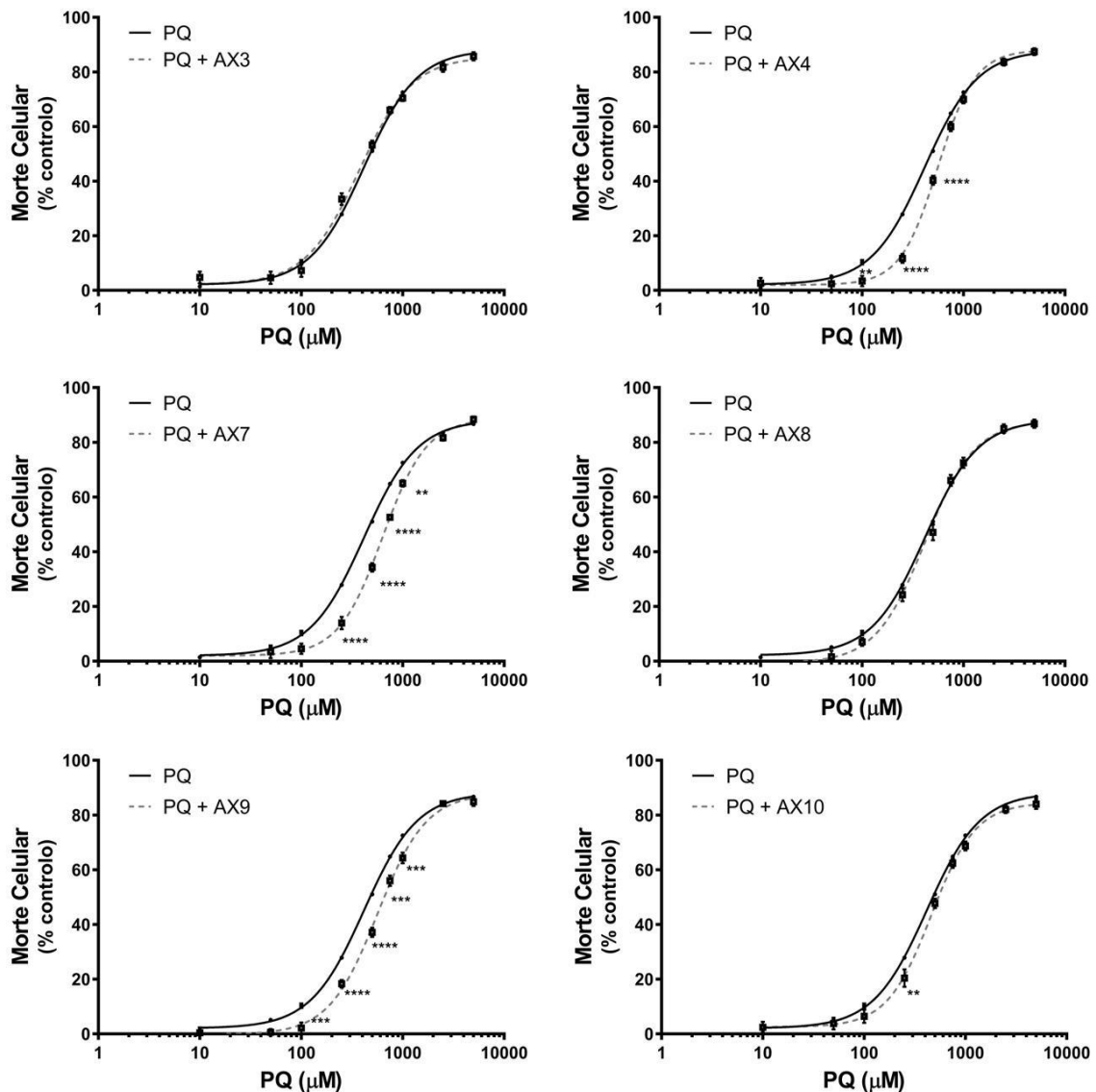
	PQ	PQ + AX1	PQ + AX2	PQ + AX5	PQ + AX6	PQ + AX12	PQ + AX16
<b>EC<sub>50</sub></b> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo, µM)	457,8	<b>560,3****</b>	<b>519,8**</b>	463,3	475,6	<b>546,6****</b>	493,3
<b>TOP</b> (máximo de morte celular, % controlo)	89,63	87,41	88,37	89,89	85,96	86,17	<b>85,10*</b>
<b>BOTTOM</b> (mínimo de morte celular, % controlo)	2,294	-0,035	0,756	0,301	0,048	0,433	0,311
<b>Hill Slope</b>	1,659	1,943	2,114**	1,755	1,845	1,971*	1,786
<b>Valor de p</b> (comparação entre as curvas traçadas)	-	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,1965	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>

As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + AXs foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  PQ + AXs vs. PQ).

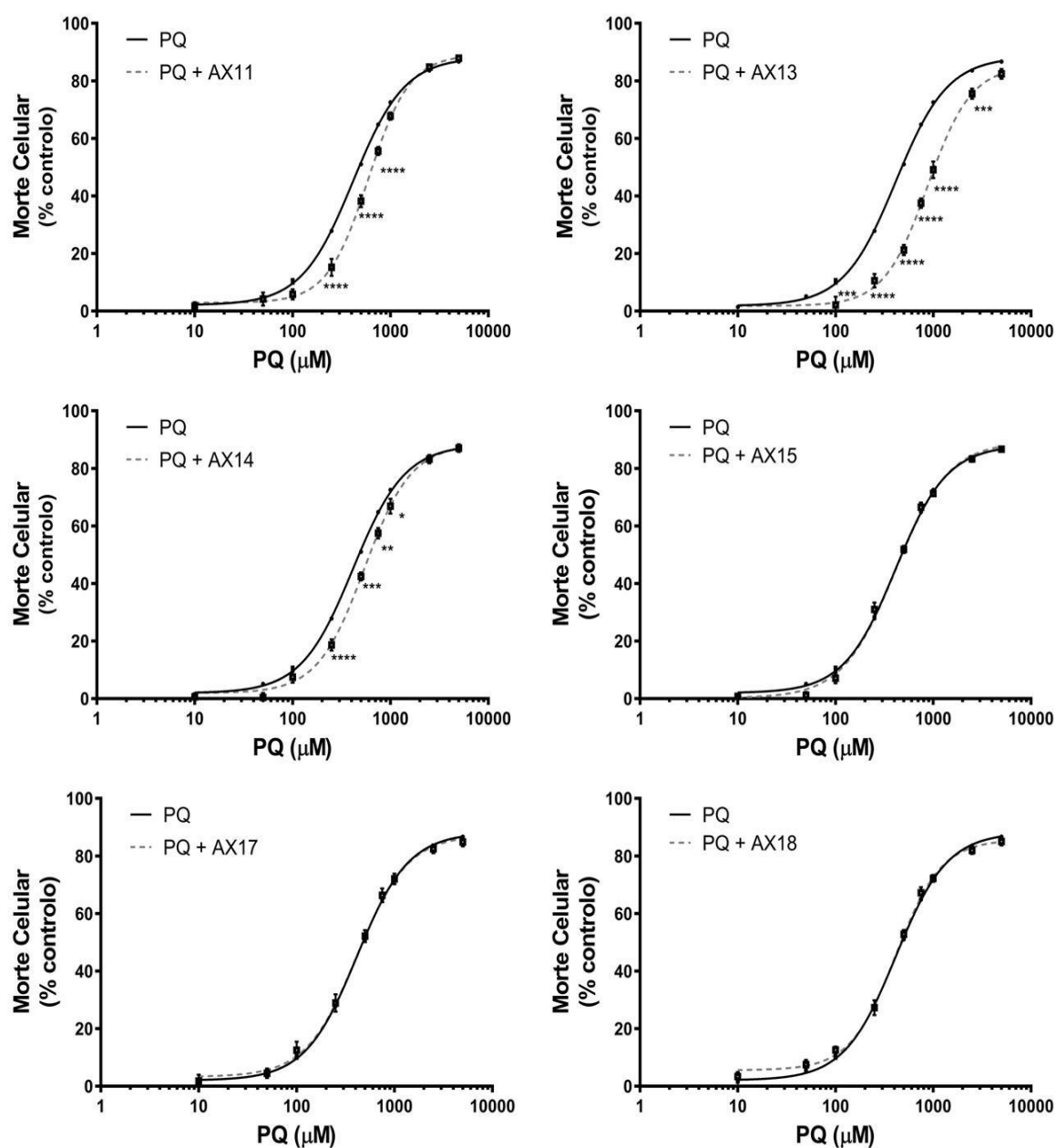
Analisando a **Figura 14** relativa à avaliação do efeito das xantonas do grupo B na toxicidade do PQ, é possível verificar que as xantonas **AX4**, **AX7**, **AX9**, **AX10**, **AX11**, **AX13** e **AX14**, quando incubadas simultaneamente com o PQ levaram a um decréscimo significativo na morte celular para as concentrações de PQ entre 100 e 1000 µM, resultando num desvio significativo para a direita das curvas **PQ + AXs**, em comparação com a curva que representa apenas a exposição ao herbicida (**PQ**). Observando a **Tabela 5**, conclui-se que não existem diferenças significativas quer no TOP quer no BOTTOM de todas as curvas **PQ + AXs** em comparação com a curva **PQ** e, deste modo, o valor de EC<sub>50</sub> foi utilizado como medida de comparação entre as curvas traçadas. Deste modo, os resultados obtidos mostram que a exposição simultânea ao PQ e às xantonas **AX4**, **AX7**, **AX9**, **AX10**, **AX11**, **AX13** ou **AX14** resultou num aumento significativo do valor de EC<sub>50</sub> do PQ, quando comparado com a exposição das células Caco-2 apenas ao herbicida [549,4; 628,7; 564,1; 461,7; 595,4; 870,6 e 531,5 µM para a exposição simultânea a AX4, AX7,

AX9, AX10, AX11, AX13 e AX14, respetivamente, em comparação com o valor de EC<sub>50</sub> obtido na curva PQ (415,5 µM)] (**Tabela 5**), demonstrando o importante efeito protetor destes derivados xantónicos relativamente à citotoxicidade deste substrato tóxico da P-gp. No que diz respeito às xantonas **AX3**, **AX15**, **AX17** e **AX18** não se observam diferenças significativas entre as curvas PQ e as curvas PQ + AXs, o que indica que estas não conferem proteção contra a citotoxicidade induzida pelo PQ. Relativamente à **AX8**, apesar de se verificar uma diferença significativa entre as curvas **PQ** e **PQ + AX8**, não se observaram diferenças significativas entre os valores de EC<sub>50</sub>, TOP e BOTTOM entre ambas as curvas (**Tabela 5**). Desta forma, pode concluir-se que, entre os derivados xantónicos do grupo B, as xantonas **AX7** e **AX13** são as que se apresentam como os compostos mais promissores devido à elevada proteção que conferem contra a citotoxicidade provocada pelo PQ.

Entre os derivados xantónicos do grupo B que protegeram contra a toxicidade do PQ, a **AX7** e **AX13** (responsáveis pela maior proteção entre os derivados xantónicos do grupo B) aumentaram significativamente a atividade da P-gp demonstrando ser ativadores desta bomba de efluxo (**Figura 9**). Do mesmo modo, a **AX9** demonstrou induzir significativamente a expressão da P-gp (**Figura 8**) resultando num aumento, embora não significativo, na atividade da proteína (**Figura 10**), 24 h após exposição. Contudo, compostos como a **AX4**, **AX10**, **AX11** e **AX14**, que demonstraram a capacidade de proteger as células Caco-2 contra a toxicidade mediada pelo PQ (**Figura 14**), não induziram qualquer alteração significativa na expressão e atividade da P-gp (**Figura 8**, **Figura 9** e **Figura 10**). Do mesmo modo, a **AX17**, que ativou significativamente a P-gp (**Figura 9**), ou a **AX3** e **AX8**, que induziram um aumento significativo na expressão da proteína (**Figura 8**), falharam na proteção contra a citotoxicidade do herbicida (**Figura 14**, **Tabela 5**). Por esse motivo, é importante verificar se os efeitos protetores observados são mediados por um mecanismo de indução e/ou ativação da P-gp.



**Figura 14.** Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + AXs) das AXs testadas (20  $\mu\text{M}$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes (realizadas em triplicado). As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + AXs (LOG EC50, Hill Slope, máximo e mínimo de morte celular) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando Two-way ANOVA, seguido do *Sidak's multiple comparisons post hoc test* (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  PQ + AXs vs. PQ). Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



**Figura 14 (cont.).** Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + AXs) das AXs testadas (20  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 5** - Valores de EC<sub>50</sub> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (efeito mínimo) e Hill slope das curvas concentração-resposta ao paraquato obtidas com (PQ + AXs) ou sem (PQ) exposição simultânea aos derivados xantônicos (20 µM).

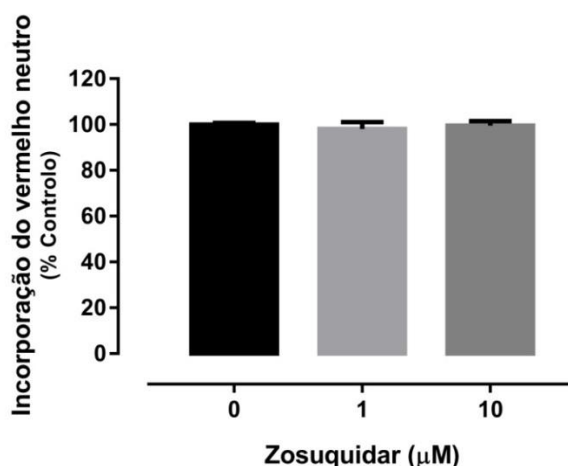
	PQ	PQ + AX3	PQ + AX4	PQ + AX7	PQ + AX8	PQ + AX9	PQ + AX10
<b>EC<sub>50</sub></b> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo, µM)	415,5	372,2	549,4****	628,7****	437,2	564,1****	461,7*
<b>TOP</b> (máximo de morte celular, % controlo)	88,23	85,63	86,64	88,97	88,52	87,94	84,51
<b>BOTTOM</b> (mínimo de morte celular, % controlo)	2,063	2,115	2,115	1,233	0,03184	-0,2384	2,498
<b>Hill Slope</b>	1,646	1,648	2,440****	1,950	1,800	1,811	1,991*
<b>Valor de p</b> (comparação entre as curvas traçadas)	-	0,2607	< 0,0001	< 0,0001	0,0168	< 0,0001	< 0,0001

	PQ	PQ + AX11	PQ + AX13	PQ + AX14	PQ + AX15	PQ + AX17	PQ + AX18
<b>EC<sub>50</sub></b> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo, µM)	415,5	595,4****	870,6****	531,5****	377,3	387,2	405,0
<b>TOP</b> (máximo de morte celular, % controlo)	88,23	89,08	86,55	88,95	87,61	86,35	85,36
<b>BOTTOM</b> (mínimo de morte celular, % controlo)	2,063	2,872	-0,2452	0,4632	-1,001	2,247	5,174
<b>Hill Slope</b>	1,646	2,059*	1,781	1,729	1,596	1,649	1,845
<b>Valor de p</b> (comparação entre as curvas traçadas)	-	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,3147	0,6493	0,2110

As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + AXs foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  PQ + AXs vs. PQ).

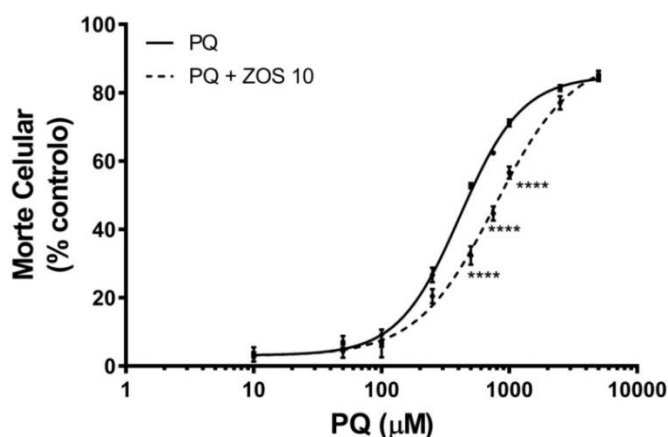
Para verificar se o papel protetor dos derivados xantônicos contra a citotoxicidade do PQ é devido à indução/ativação da P-gp, este ensaio deve ser avaliado na presença de um inibidor específico da proteína. Para o efeito, o ZOS, potente inibidor da P-gp de 3ª geração foi utilizado. No entanto, antes de efetuar os ensaios anteriores na presença do inibidor, foi necessário avaliar a sua citotoxicidade de forma a selecionar uma concentração não citotóxica de ZOS a utilizar. Para o efeito, as células Caco-2 foram expostas a ZOS 1 e 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h e a sua citotoxicidade posteriormente avaliada pelo ensaio de incorporação do NR. Tal como se pode observar na **Figura 15**, nas condições experimentais utilizadas, e após 24 h de exposição, não se verificou qualquer diminuição significativa na viabilidade celular para as duas concentrações de ZOS testadas, demonstrando tratar-se de concentrações não citotóxicas para as células Caco-2, pelo menos após o tempo de exposição testado.



**Figura 15.** Citotoxicidade do Zosuquidar (1 e 10  $\mu\text{M}$ ) em células Caco – 2, avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, 24 horas após a exposição. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de 2 e 5 experiências independentes (realizadas em triplicado), no caso de ZOS 1 e 10  $\mu\text{M}$ , respetivamente. As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o método não paramétrico de *Kruskal–Wallis*, seguido pelo *Dunn's post hoc test*.

Deste modo, dada a ausência de citotoxicidade do ZOS 10  $\mu\text{M}$ , foi inicialmente avaliado o seu efeito na citotoxicidade do PQ, 24 h após a exposição simultânea ao herbicida e ao inibidor da P-gp. A citotoxicidade do PQ (0 – 5000  $\mu\text{M}$ ) foi igualmente avaliada pelo ensaio de incorporação do NR e os resultados estão ilustrados na **Figura 16**.





**Figura 16.** Curvas concentração-resposta (morte celular) do Paraquato, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + ZOS 10) de Zosuquidar 10  $\mu\text{M}$ . Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes (realizadas em triplicado). As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + ZOS 10 (LOG EC<sub>50</sub>, Hill Slope, máximo e mínimo de morte celular) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando Two-way ANOVA, seguido do *Sidak's multiple comparisons post hoc test* (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  PQ + ZOS 10 vs. PQ). Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

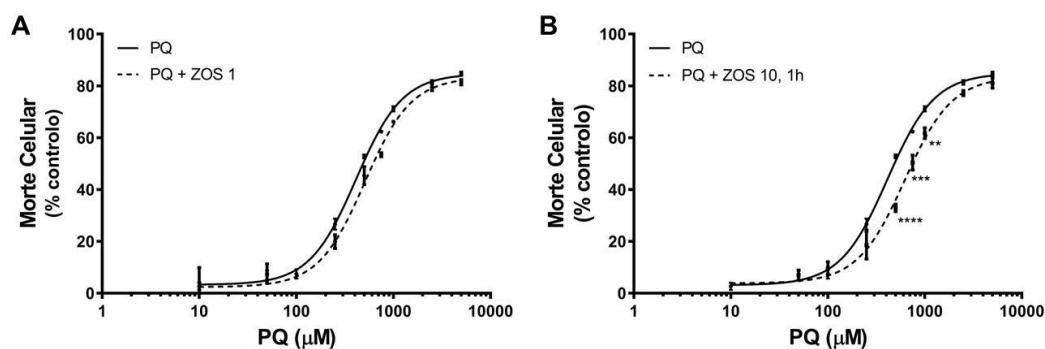
Assim, e contrariamente ao esperado, a exposição simultânea a PQ e ZOS (10  $\mu\text{M}$ ) resultou numa diminuição significativa da citotoxicidade do herbicida, comparativamente com a citotoxicidade observada nas células expostas exclusivamente a PQ. De facto, foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular para as concentrações de PQ entre 500 – 1000  $\mu\text{M}$ , resultando num desvio significativo para a direita da curva concentração-resposta PQ + ZOS 10, comparativamente com a curva PQ (**Figura 16**). Da análise da **Tabela 6** é possível verificar que não existem diferenças significativas entre os valores de TOP e BOTTOM das curvas PQ e PQ + ZOS 10 e, por este motivo, o valor de EC<sub>50</sub> pode ser usado como medida de comparação entre as curvas concentração-resposta obtidas. Assim, é possível verificar que a exposição simultânea das células Caco-2 a PQ (0 – 5000  $\mu\text{M}$ ) e ZOS (10  $\mu\text{M}$ ) resultou num aumento significativo do valor de EC<sub>50</sub> da curva traçada, quando comparado com a curva obtida após exposição isolada ao herbicida, demonstrando um efeito protetor do ZOS contra a citotoxicidade induzida pelo PQ (o valor de EC<sub>50</sub> aumentou significativamente para 771,1  $\mu\text{M}$  no caso da curva PQ + ZOS 10, quando comparado com o valor de EC<sub>50</sub> de 412,5  $\mu\text{M}$  obtido para a cura PQ) (**Tabela 6**).

Sabendo que o PQ é transportado ativamente para o exterior das células por um mecanismo dependente da P-gp, era expectável que a inibição desta bomba de efluxo, pelo ZOS, se traduzisse numa diminuição do efluxo do herbicida, num consequente aumento da sua concentração intracelular e, consequentemente, num aumento da sua citotoxicidade, à semelhança do que foi previamente demonstrado na mesma linha celular usando o elacridar como inibidor da P-gp [63, 64]. Para melhor elucidar o efeito mediado pelo ZOS na citotoxicidade do PQ foram testados dois novos protocolos de incubação com o inibidor da P-gp:

1. **Exposição simultânea a PQ (0 – 5000  $\mu$ M) e ZOS 1  $\mu$ M durante 24 h**, diminuindo, assim, a concentração de inibidor, de forma a avaliar se o efeito protetor observado se deveria à eventual perda de especificidade do ZOS pela sua presença numa concentração mais elevada, uma vez que se trata de um inibidor de 3ª geração e, por isso, bastante potente;
2. **Pré-incubação das células Caco-2 com ZOS 10  $\mu$ M durante 1 h**, seguindo-se a remoção do inibidor e exposição das células ao PQ (0 – 5000  $\mu$ M) durante 24 h. O objetivo deste segundo protocolo foi o de verificar se o efeito protetor observado se deveria a uma reatividade direta entre o herbicida e o inibidor, tal como já foi anteriormente descrito para outros compostos [78]. Assim, a reatividade direta do PQ com o inibidor no meio de cultura aquando da exposição das células poderia resultar numa diminuição da quantidade de herbicida disponível para ser absorvido pelas mesmas e, consequentemente, numa redução da sua citotoxicidade.

No entanto, tal como se pode observar na **Figura 17**, em ambos os protocolos de exposição ao ZOS, foi possível verificar um efeito semelhante ao observado na exposição simultânea a ZOS 10  $\mu$ M, ou seja, um desvio significativo para a direita das curvas PQ + ZOS 1 e PQ + ZOS 10 1h, quando comparadas com a curva PQ, demonstrando uma redução da citotoxicidade do herbicida. Adicionalmente, essa redução significativa na citotoxicidade do herbicida resultou num aumento significativo do valor de  $EC_{50}$  para as curvas concentração resposta PQ + ZOS 1 e PQ + ZOS 10 1h, quando comparado com o valor de  $EC_{50}$  obtido após exposição ao PQ isoladamente (505 e 622,7  $\mu$ M para as curvas PQ + ZOS 1 e PQ + ZOS 10 1h, quando comparado com o valor de 412,5  $\mu$ M obtido para a curva PQ) (**Tabela 6**). Deste modo, serão necessários mais estudos para avaliar

por que mecanismo(s) o ZOS está a proteger as células Caco-2 contra a citotoxicidade do PQ, nomeadamente perceber se poderá estar igualmente a bloquear o(s) transportador(es) envolvido(s) na entrada do herbicida dentro das células, traduzindo-se esta inibição num efeito muito mais marcado que o resultante da inibição da P-gp. Do mesmo modo, futuros ensaios serão realizados usando um outro inibidor da P-gp, o elacridar, para demonstrar se os efeitos protetores observados contra a citotoxicidade do PQ, após exposição simultânea a alguns derivados xantônicos, se devem a um mecanismo mediado pela P-gp. Este inibidor será utilizado, no futuro, tendo em consideração os resultados obtidos em estudos anteriores nos quais se verificou que a exposição simultânea a PQ e elacridar resultou num aumento significativo da toxicidade do herbicida [63, 64].



**Figura 17. A.** Curvas concentração-resposta (morte celular) do PQ, obtidas na ausência (PQ) e na presença (PQ + ZOS 1) de ZOS 1 μM. Os resultados são apresentados como média ± SEM de 4 e 1 experiências independentes (realizadas em triplicado), para as curvas PQ e PQ + ZOS 1, respetivamente (apenas foi efetuada uma experiência independente testando a exposição simultânea a PQ e ZOS 1 μM, condição essa que será repetida no futuro). **B.** Curvas concentração-resposta (morte celular) do PQ, obtidas com (PQ + ZOS 10, 1h) ou sem (PQ) pré-incubação com ZOS (10 μM), 1 h antes da exposição ao PQ. Os resultados são apresentados como média ± SEM de 4 e 2 experiências independentes (realizadas em triplicado), para as curvas PQ e PQ + ZOS 10, 1h, respetivamente. As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + ZOS (LOG EC<sub>50</sub>, *Hill Slope*, máximo e mínimo de morte celular) foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. As comparações estatísticas foram efetuadas usando *Two-way ANOVA*, seguido do *Sidak's multiple comparisons post hoc test* (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001 PQ + ZOS vs. PQ). Em todos os casos, valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

**Tabela 6** - Valores de  $EC_{50}$  (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo), TOP (efeito máximo), BOTTOM (efeito mínimo) e Hill slope das curvas concentração-resposta ao PQ obtidas com (PQ + ZOS) ou sem (PQ) exposição ao ZOS (1 e 10  $\mu$ M). A citotoxicidade do PQ foi avaliada após exposição simultânea a PQ (0-5000  $\mu$ M) e zosuquidar 1 e 10  $\mu$ M (PQ + ZOS 1 e PQ + ZOS 10, respetivamente) durante 24 h, bem como com pré - exposição ao inibidor (10  $\mu$ M) durante 1 h, antes da exposição ao PQ durante 24 h ( PQ + ZOS 10, 1 h ).

	PQ	PQ + ZOS 10 $\mu$ M	PQ + ZOS 1 $\mu$ M	PQ + ZOS 10 $\mu$ M, 1h
<b><math>EC_{50}</math></b> (concentração de PQ que induz metade do efeito máximo, $\mu$ M)	412,5	771,1****	505*	622,7****
<b>TOP</b> (máximo de morte celular, % controlo)	84,9	90,83	82,17	83,75
<b>BOTTOM</b> (mínimo de morte celular, % controlo)	3,121	2,997	3,015	3,697
<b>Hill Slope</b>	1,788	1,426	1,983	1,759
<b>Valor de p</b> (comparação entre as curvas traçadas)	-	<0,0001	0,0085	<0,0001

As curvas concentração-resposta foram traçadas usando o método dos mínimos quadrados, e as comparações entre as curvas PQ e PQ + ZOS foram efetuadas usando o *extra sum-of-squares F test*. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  PQ + ZOS vs. PQ).

Em conclusão, os resultados obtidos demonstram que alguns dos derivados xantónicos testados apresentaram a capacidade de aumentar significativamente a atividade e/ou expressão da P-gp, constituindo um grupo de compostos promissores. Por outro lado, a exposição simultânea a PQ e algumas das xantonas testadas resultou numa diminuição significativa da toxicidade do herbicida. À semelhança destes resultados, estudos anteriores efetuados igualmente em células Caco-2 demonstraram a capacidade de novos derivados xantónicos e tioxantónicos para aumentar significativamente a expressão e atividade desta proteína, resultando numa proteção significativa contra a citotoxicidade do PQ [63, 64]. Nesses estudos foi possível verificar que o efeito protetor observado era mediado pela P-gp, dado o seu desaparecimento (total ou praticamente total) quando a exposição era efetuada na presença de um inibidor da P-gp, o elacridar.

## PARTE V





## 5. Conclusões

A Glicoproteína-P é uma proteína transportadora dependente de ATP, codificada pelo gene *MDR1* em humanos, e responsável pela mediação do fenómeno de MDR. Contudo, está amplamente distribuída em diversos órgãos e tecidos, desempenhando um papel ativo no efluxo de compostos potencialmente tóxicos, atuando assim como mecanismo de defesa celular uma vez que contribui para a diminuição da acumulação intracelular destes compostos e, consequentemente, da sua toxicidade. Este importante papel desempenhado pela P-gp tem levado, nos últimos anos, a um estudo cada vez mais exaustivo do mecanismo de indução/ativação desta proteína. Por este motivo, diversos derivados xantónicos vêm sendo estudados quanto à sua capacidade de aumentar a expressão e/ou atividade desta bomba de efluxo e, dessa forma, promover uma proteção das células em casos de exposição a substratos tóxicos da P-gp como, por exemplo, o PQ. De facto, esses estudos constituíram o ponto de partida para que no presente estudo se identificassem novos derivados xantónicos capazes de provocar a indução/ativação da P-gp, avaliando a sua capacidade para aumentarem a expressão e atividade desta bomba de efluxo e, posteriormente, avaliando a sua potencial capacidade de proteção de células Caco-2 contra a toxicidade mediada pelo PQ. Foi possível verificar que os derivados xantónicos testados não provocaram citotoxicidade neste modelo celular para concentrações iguais ou inferiores a 20  $\mu$ M, 24 h após exposição. Adicionalmente, foi possível verificar que diversos derivados xantónicos, como a **AX1**, **AX2**, **AX5**, **AX6**, **AX7**, **AX12**, **AX13** e **AX17**, apresentaram a capacidade de aumentar imediatamente a atividade da proteína, funcionando como ativadores da P-gp. Verificou-se, igualmente, que alguns compostos aumentaram significativamente a expressão da P-gp, embora se tenha verificado que a atividade da proteína não aumentou proporcionalmente. Contudo, para os derivados xantónicos do grupo B é necessário efetuar mais estudos de avaliação da atividade da P-gp 24 h após exposição aos compostos, de forma a verificar se as diferenças encontradas se tornam significativas.

Por outro lado, diversas xantonas demonstraram a capacidade de proteger as células Caco-2 contra a citotoxicidade induzida pelo PQ, nomeadamente a **AX1**,

**AX2, AX4, AX7, AX9, AX10, AX11, AX12, AX13 e AX14**, resultando num aumento significativo do EC<sub>50</sub> do herbicida. Dos derivados xantônicos testados, a **AX13** apresentou o maior efeito protetor entre todos os compostos testados. Alguns dos derivados xantônicos que protegeram contra a citotoxicidade do PQ, como a **AX1, AX2, AX7, AX12 e AX13**, demonstraram a capacidade de ativar imediatamente a P-gp. Por outro lado, a **AX9**, que apresentou igualmente um significativo efeito protetor contra o PQ, aumentou significativamente a expressão da proteína, resultando num aumento, embora não significativo (dado o numero reduzido de experiências efetuadas) da sua atividade. Contudo, a proteção observada contra a citotoxicidade do PQ na presença das **AX4, AX10, AX11 e AX14** não pode, de acordo com os resultados obtidos, ser justificada por qualquer efeito despoletado por estes compostos na expressão e atividade da P-gp. Do mesmo modo, compostos, como a **AX5, AX6 e AX17**, que aumentaram significativamente a atividade da P-gp funcionando como ativadores, ou compostos, como a **AX3 e AX8**, que induziram a sua expressão, não foram capazes de desempenhar um papel protetor contra a citotoxicidade mediada pelo PQ. Deste modo, torna-se importante verificar se a ação protetora desencadeada pelas xantonas testadas se deve, total ou parcialmente, a um fenómeno de indução/ativação da P-gp. Para o efeito, novos estudos serão realizados na presença de um inibidor da P-gp com o objetivo de verificar o potencial desaparecimento (total ou parcial) dos efeitos protetores observados.

Em conclusão, o presente estudo demonstra que é possível encarar a indução/ativação da P-gp como uma potencial via antidotal em casos de intoxicações com substratos tóxicos da P-gp, reduzindo a sua acumulação intracelular e, conseqüentemente, a sua toxicidade. Por outro lado, os derivados xantônicos demonstraram mais uma vez ser uma importante classe de compostos com capacidade de interagir com esta bomba de efluxo, aumentando a sua expressão e/ou atividade. Assim, com bases nos resultados obtidos, novos derivados poderão ser sintetizados e testados, revelando novas perspetivas na prevenção de intoxicações induzidas por PQ ou outros substratos da P-gp.



## PARTE VI





## 6. Referências Bibliográficas

- [1] A. Siarheyeva, R. Liu, and F. J. Sharom, "Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, pp. 7575-86, Mar 5 2010.
- [2] S. V. Ambudkar, I. W. Kim, and Z. E. Sauna, "The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, pp. 392-400, Apr 2006.
- [3] S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna, and M. M. Gottesman, "P-glycoprotein: from genomics to mechanism," *Oncogene*, vol. 22, pp. 7468-85, Oct 20 2003.
- [4] M. Hennessy and J. P. Spiers, "A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter," *Pharmacological Research*, vol. 55, 2007.
- [5] R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, R. J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. de Lourdes Bastos, *et al.*, "Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy," *Pharmacol Ther*, vol. 149, pp. 1-123, May 2015.
- [6] M. K. DeGorter, C. Q. Xia, J. J. Yang, and R. B. Kim, "Drug transporters in drug efficacy and toxicity," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 52, pp. 249-73, 2012.
- [7] K. M. R. Srivalli and P. K. Lakshmi, "Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 48, pp. 353-367, 2012.
- [8] S. F. Zhou, "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition," *Xenobiotica*, vol. 38, pp. 802-32, Jul 2008.
- [9] E. M. del Amo, A. T. Heikkinen, and J. Monkkonen, "In vitro-in vivo correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 36, pp. 200-11, Feb 15 2009.
- [10] T. Ishikawa, H. Hirano, Y. Onishi, A. Sakurai, and S. Tarui, "Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses," *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, vol. 19, pp. 1-14, Feb 2004.

- [11] F. J. Sharom, "The P-glycoprotein multidrug transporter," *Essays Biochem*, vol. 50, pp. 161-78, Sep 7 2011.
- [12] R. L. Juliano and V. Ling, "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 455, pp. 152-162, 1976.
- [13] F. J. Azeredo, F. D. T. Uchôa, and T. D. Costa, "P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions," *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 90, pp. 321-326, 2009.
- [14] A. Fortuna, G. Alves, and A. Falcão, "In vitro and In vivo Relevance of the P-glycoprotein Probe Substrates in Drug Discovery and Development: Focus on Rhodamine 123, Digoxin and Talinolol," *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, vol. S2, 2011.
- [15] G. Chang, "Multidrug resistance ABC transporters," *FEBS Letters*, vol. 555, pp. 102-105, 2003.
- [16] F. J. Sharom, "Multidrug Resistance Protein (P-Glycoprotein; MDR1)," 2008.
- [17] E. M. Leslie, R. G. Deeley, and S. P. Cole, "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 204, pp. 216-37, May 1 2005.
- [18] R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, R. J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. d. L. Bastos, *et al.*, "Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 149, pp. 1-123, 2015.
- [19] V. Vilas-Boas, R. Silva, A. Palmeira, E. Sousa, L. M. Ferreira, P. S. Branco, *et al.*, "Development of Novel Rifampicin-Derived P-Glycoprotein Activators/Inducers. Synthesis, In Silico Analysis and Application in the RBE4 Cell Model, Using Paraquat as Substrate," *PLoS One*, vol. 8, p. e74425, 2013.
- [20] T. Mizutani, T. Nakamura, R. Morikawa, M. Fukuda, W. Mochizuki, Y. Yamauchi, *et al.*, "Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro," *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 419, pp. 238–243, 2012.

- 
- [21] S. F. Zhou, "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition," *Xenobiotica*, vol. 38, pp. 802–832, 2008.
- [22] S. Choudhuri and C. D. Klaassen, "Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters," *International Journal of Toxicology*, vol. 25, pp. 231-59, Jul-Aug 2006.
- [23] R. Masereeuw, S. Notenboom, P. H. Smeets, A. C. Wouterse, and F. G. Russel, "Impaired renal secretion of substrates for the multidrug resistance protein 2 in mutant transport-deficient (TR-) rats," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 14, pp. 2741-9, Nov 2003.
- [24] J. H. Lin and M. Yamazaki, "Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 42, pp. 59-98, 2003.
- [25] T. P. Schaub, J. Kartenbeck, J. König, H. Spring, J. Dorsam, G. Staehler, *et al.*, "Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 10, pp. 1159-69, Jun 1999.
- [26] B. Döring and E. Petzinger, "Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 46, pp. 261-82, Aug 2014.
- [27] K. L. Mealey, "Therapeutic implications of the MDR-1 gene," *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 27, pp. 257-264, 2004.
- [28] M. V. Varma, Y. Ashokraj, C. S. Dey, and R. Panchagnula, "P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement," *Pharmacological Research*, vol. 48, pp. 347-59, Oct 2003.
- [29] M. L. Amin, "P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery," *Drug Target Insights*, vol. 7, pp. 27-34, 2013.
- [30] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, and M. C. Willingham, "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 84, pp. 7735-8, Nov 1987.
- [31] K. D. Yu, "The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions," *Journal of clinical pharmacology*, vol. 39, pp. 1203-1211, 1999.

- [32] S. Manceau, C. Giraud, X. Decleves, F. Batteux, C. Chereau, S. Chouzenoux, *et al.*, "Expression and induction by dexamethasone of ABC transporters and nuclear receptors in a human T-lymphocyte cell line," *Journal of Chemotherapy*, vol. 24, pp. 48-55, Feb 2012.
- [33] K. Kock, M. Grube, G. Jedlitschky, L. Oevermann, W. Siegmund, C. A. Ritter, *et al.*, "Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy," *Clinical Pharmacokinetics* vol. 46, pp. 449-70, 2007.
- [34] P. M. Chaudhary and I. B. Roninson, "Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells," *Cell*, vol. 66, pp. 85-94, Jul 12 1991.
- [35] F. Funakoshi, T. Murakami, R. Yumoto, Y. Kiribayash, and M. Takano, "Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics and Drug Interactions of Digoxin andb-Methyldigoxin in Rats," *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, vol. 92, pp. 1455-1463, 2003.
- [36] M. M. Gottesman and I. Pastan, "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 62, pp. 385-427, 1993.
- [37] F. J. Sharom, "The P-glycoprotein multidrug transporter," *Essays in Biochemistry*, vol. 50, pp. 161–178, 2011.
- [38] R. B. Kim, "Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 34, pp. 47-54, Feb-May 2002.
- [39] C. J. Matheny, M. W. Lamb, K. R. Brouwer, and G. M. Pollack, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation," *Pharmacotherapy*, vol. 21, pp. 778-96, Jul 2001.
- [40] F. J. Sharom, "Multidrug Resistance Protein: P-Glycoprotein," in *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*, G. You and M. E. Morris, Eds., ed, 2007.
- [41] F. J. Sharom, X. Yu, and C. A. Doige, "Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, pp. 24197-202, 1993.

- [42] A. Palmeira, E. Sousa, M. H. Vasconcelos, and M. M. Pinto, "Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 1946-2025, 2012.
- [43] T. Eichhorn and T. Efferth, "P-glycoprotein and its inhibition in tumors by phytochemicals derived from Chinese herbs," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 141, pp. 557-70, Jun 1 2012.
- [44] J. D. Wessler, L. T. Grip, J. Mendell, and R. P. Giugliano, "The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs," *Journal of the American College of Cardiology* vol. 61, pp. 2495-502, Jun 25 2013.
- [45] K. Sterz, L. Mçllmann, A. Jacobs, D. Baumert, and M. Wiese, "Activators of P-glycoprotein: Structure–Activity Relationships and Investigation of their Mode of Action," *ChemMedChem*, vol. 4, pp. 1897 – 1911, 2009.
- [46] L. Xu, J. Xu, and Z. Wang, "Molecular mechanisms of paraquat-induced acute lung injury: a current review," *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 37, pp. 130-4, Apr 2014.
- [47] T. Martins, "Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas," *Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 34, pp. 175-186, 2013.
- [48] Z. BL, Y. L, and O. Y, "Literature analysis of paraquat poisoning in China (1991–2008)," *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, vol. 30, pp. 139–141, 2010.
- [49] R. J. Dinis-Oliveira, J. A. Duarte, A. Sanchez-Navarro, F. Remiao, M. L. Bastos, and F. Carvalho, "Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 38, pp. 13-71, 2008.
- [50] T. Fukushima, K. Tanaka, H. Lim, and M. Moriyama, "Mechanism of Cytotoxicity of Paraquat," *Environmental Health and Preventive Medicine*, vol. 7, pp. 89–94, 2002.
- [51] R. J. Dinis-Oliveira, J. A. Duarte, F. Remiao, A. Sanchez-Navarro, M. L. Bastos, and F. Carvalho, "Single high dose dexamethasone treatment decreases the pathological score and increases the survival rate of paraquat-intoxicated rats," *Toxicology*, vol. 227, pp. 73-85, Oct 3 2006.

- [52] R. J. Dinis-Oliveira, F. Remiao, J. A. Duarte, R. Ferreira, A. Sanchez Navarro, M. L. Bastos, *et al.*, "P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 41, pp. 1213-24, Oct 15 2006.
- [53] R. Silva, H. Carmo, R. Dinis-Oliveira, A. Cordeiro-da-Silva, S. C. Lima, F. Carvalho, *et al.*, "In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells," *Arch Toxicol*, vol. 85, pp. 315-326, Apr 2011.
- [54] R. Silva, H. Carmo, V. Vilas-Boas, D. J. Barbosa, A. Palmeira, E. Sousa, *et al.*, "Hypericin-mediated P-glycoprotein induction protects caco-2 cells against paraquat toxicity: In vitro and in silico studies," *Toxicology Letters*, vol. 238, p. S317, 10/16/ 2015.
- [55] V. Vilas-Boas, R. Silva, A. R. Gaio, A. M. Martins, S. C. Lima, A. Cordeiro-da-Silva, *et al.*, "P-glycoprotein activity in human Caucasian male lymphocytes does not follow its increased expression during aging," *Cytometry Part A*, vol. 79, pp. 912-9, Nov 2011.
- [56] R. Silva, H. Carmo, R. Dinis-Oliveira, A. Cordeiro-da-Silva, S. C. Lima, F. Carvalho, *et al.*, "In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells," *Archives of Toxicology*, vol. 85, pp. 315-26, Apr 2011.
- [57] G. D. Eytan, R. Regev, G. Oren, and Y. G. Assaraf, "The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, pp. 12897-902, May 31 1996.
- [58] J. S. Negi, V. K. Bisht, P. Singh, M. S. M. Rawat, and G. P. Joshi, "Naturally Occurring Xanthones: Chemistry and Biology," *Journal of Applied Chemistry*, pp. 1-9, 2013.
- [59] E. Genoux-Bastide, D. Lorendeau, E. Nicolle, S. Yahiaoui, S. Magnard, A. Di Pietro, *et al.*, "Identification of xanthones as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1," *ChemMedChem*, vol. 6, pp. 1478-84, Aug 1 2011.
- [60] K. S. Masters and S. Brase, "Xanthones from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis," *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 3717-76, Jul 11 2012.



- 
- [61] M. M. Pinto, M. E. Sousa, and M. S. Nascimento, "Xanthone derivatives: new insights in biological activities," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 12, pp. 2517-38, 2005.
- [62] E. Sousa, A. Palmeira, A. S. Cordeiro, B. Sarmento, D. Ferreira, R. T. Lima, *et al.*, "Bioactive xanthenes with effect on P-glycoprotein and prediction of intestinal absorption," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 22, pp. 2115–2123, 2013.
- [63] R. Silva, E. Sousa, H. Carmo, A. Palmeira, D. J. Barbosa, M. Gameiro, *et al.*, "Induction and activation of P-glycoprotein by dihydroxylated xanthenes protect against the cytotoxicity of the P-glycoprotein substrate paraquat," *Archives of Toxicology* vol. 88, pp. 937-51, Apr 2014.
- [64] S. R. P. A. C. H. B. D. G. M. G. A. *et al.*, "P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity," *Archives of Toxicology* vol. 89, pp. 1783-1800, 2014.
- [65] V. Vilas-Boas, R. Silva, A. Palmeira, E. Sousa, L. M. Ferreira, P. S. Branco, *et al.*, "Development of Novel Rifampicin-Derived P-Glycoprotein Activators/Inducers. Synthesis, *In Silico* Analysis and Application in the RBE4 Cell Model, Using Paraquat as Substrate," *Plos One*, vol. 8, 2013.
- [66] Y. Cai, ChenshuXu, PeiyiChen, J. Hu, RongHu, M. Huang, *et al.*, "Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* vol. 70, pp. 175–181, 2014.
- [67] Y. Sambuy, I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stammati, and F. Zucco, "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 21, pp. 1-26, 2005.
- [68] W. J. ROTH, D. J. LINDLEY, S. M. CARL, and G. T. KNIPP, "The Effects of Intralaboratory Modifications to Media Composition and Cell Source on the Expression of Pharmaceutically Relevant Transporters and Metabolizing Genes in the Caco-2 Cell Line," *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101, 2012.
- [69] P. Artursson, K. Palm, and K. Luthman, "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport," *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 46, pp. 27-43, 2001.

- [70] J. Kublbeck, J. J. Hakkarainen, A. Petsalo, K. S. Vellonen, A. Tolonen, P. Reponen, *et al.*, "Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic Capacity," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 105, pp. 941-9, Feb 2016.
- [71] V. Meunier, M. Bourrie, Y. Berger, and G. Fabre, "The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications " *Cell Biology and Toxicology*, vol. 11, pp. 187-194, 1995.
- [72] M. Gallego, C. Grootaert, L. Mora, M. C. Aristoya, J. V. Camp, and F. Toldrá, "Transepithelial transport of dry-cured hampeptides with ACE inhibitory activity through aCaco-2 cell monolayer," *Journal of Functional Foods* vol. 21, pp. 388-395, 2016.
- [73] R. Silva, A. Palmeira, H. Carmo, D. J. Barbosa, M. Gameiro, A. Gomes, *et al.*, "P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity," *Arch Toxicol*, vol. 89, pp. 1783-800, Oct 2015.
- [74] C. W. Lowik, M. J. Alblas, M. van de Ruit, S. E. Papapoulos, and G. van der Pluijm, "Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red," *Analytical Biochemistry*, vol. 213, pp. 426-33, Sep 1993.
- [75] G. Repetto, A. del Peso, and J. L. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity," *Nature Protocols*, vol. 3, pp. 1125-31, 2008.
- [76] E. Borenfreund, H. Babich, and N. Martin-Alguacil, "Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests," *Toxicology in Vitro*, vol. 2, pp. 1-6, 1988.
- [77] R. Silva, H. Carmo, V. Vilas-Boas, D. J. Barbosa, A. Palmeira, E. Sousa, *et al.*, "Colchicine effect on P-glycoprotein expression and activity: in silico and in vitro studies," *Chem Biol Interact*, vol. 218, pp. 50-62, Jul 25 2014.
- [78] R. J. Dinis-Oliveira, P. G. de Pinho, A. C. Ferreira, A. M. Silva, C. Afonso, L. Bastos Mde, *et al.*, "Reactivity of paraquat with sodium salicylate: formation of stable complexes," *Toxicology*, vol. 249, pp. 130-9, Jul 30 2008.